

HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITS-
CHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG
TOXIKOLOGISCH RELEVANTER
SCHWERMETALLE NACH
CHELATEXTRAKTION
MIT 8-HYDROXYCHINOLIN,
8-MERCAPTOCHINOLIN
UND 2-METHYL-8-MERCAPTOCHINOLIN

Karlheinz Strigl

*Dr. Strigl
München
1986*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0071

AUS DEM INSTITUT FÜR RECHTSMEDIZIN DER

UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand Prof. Dr. med. W. Spann

HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG

TOXIKOLOGISCH RELEVANTER SCHWERMETALLE NACH

CHELATEXTRAKTION MIT 8-HYDROXYCHINOLIN, 8-MERCAPTO-

CHINOLIN UND 2-METHYL-8-MERCAPTOCHINOLIN

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Karlheinz Strigl
aus
Rosenheim

München 1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstätter: Priv. Doz. Dr.Dr. G. Drasch

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.6.1986

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für
Rechtsmedizin der Universität München auf An-
regung und unter Anleitung von Herrn

Priv. Doz. Dr. Dr. Drasch

angefertigt. Hiermit danke ich ihm herzlich
für seine freundliche und wertvolle Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. W. Spann danke ich für die
Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut.

Der Firma eSDe in Rosenheim danke ich für die
Bereitstellung ihres Textsystems.

1. Einleitung

2. Wichtige für den psychologischen Prozess

2.1. Wahrnehmung

2.1.1. Die Wahrnehmung des Körpers

2.1.2. Die Wahrnehmung der Umgebung

2.1.3. Die Wahrnehmung der Zeit

2.1.4. Die Wahrnehmung der Temperatur

2.1.5. Die Wahrnehmung der Lautstärke

2.1.6. Die Wahrnehmung der Farbe

2.1.7. Die Wahrnehmung der Gerüche

2.1.8. Die Wahrnehmung der Berührung

2.1.9. Die Wahrnehmung der Schmerzempfindung

2.1.10. Die Wahrnehmung der Geschmackempfindung

2.1.11. Die Wahrnehmung der Riechempfindung

2.1.12. Die Wahrnehmung der Schmerzempfindung

2.1.13. Die Wahrnehmung der Geschmackempfindung

2.1.14. Die Wahrnehmung der Riechempfindung

2.1.15. Die Wahrnehmung der Schmerzempfindung

2.1.16. Die Wahrnehmung der Geschmackempfindung

2.1.17. Die Wahrnehmung der Riechempfindung

2.1.18. Die Wahrnehmung der Schmerzempfindung

2.1.19. Die Wahrnehmung der Geschmackempfindung

2.1.20. Die Wahrnehmung der Riechempfindung

2.1.21. Die Wahrnehmung der Schmerzempfindung

2.1.22. Die Wahrnehmung der Geschmackempfindung

2.1.23. Die Wahrnehmung der Riechempfindung

2.1.24. Die Wahrnehmung der Schmerzempfindung

2.1.25. Die Wahrnehmung der Geschmackempfindung

2.1.26. Die Wahrnehmung der Riechempfindung

2.1.27. Die Wahrnehmung der Schmerzempfindung

2.1.28. Die Wahrnehmung der Geschmackempfindung

2.1.29. Die Wahrnehmung der Riechempfindung

2.1.30. Die Wahrnehmung der Schmerzempfindung

Für Everl und Uschi
in Liebe

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
2. Theorie der Komplexbildner	11
2.1 Komplexstabilität	13
2.1.1 Einfluß des Zentralatoms auf die Komplexstabilität. 14	
2.1.1.1 A Kationen	
2.1.1.2 B Kationen	
2.1.1.3 Ü Kationen	
2.1.2 Einfluß der Ligandatome auf die Komplexstabilität.. 17	
2.1.3 Einfluß der Ligandgruppen auf die Komplexstabilität 19	
2.1.4 Einfluß der Ringgröße und der Ringzahl	21
2.2 Löslichkeitseigenschaften der Chelate	22
2.3. Optische Eigenschaften der Chelate	23
2.4 Kriterien für die Beschaffenheit geeigneter Metallchelate für die Chromatographie	25
3. Theorie der Chromatographie	26
3.1 Die Trennverfahren und ihre Bedeutung für die Chromatographie von Metallchelaten	27
3.1.1 Gaschromatographie	
3.1.2 Flüssigkeitschromatographie	
3.1.2.1 Verteilungschromatographie	
3.1.2.2 Reversed-phase Chromatographie	
3.1.2.3 Adsorptionschromatographie	
3.1.2.4 Ionenaustauschchromatographie	
3.1.2.5 Ausschluß- oder Gelchromatographie	

3.2	Retention	35
3.3	Selektivität	39
3.4	Bandenverbreiterung	39
3.5	Auflösung	40
3.6	Porösität und Permeabilität	43
4.	Optimierende Methoden für die RP-HPLC	
4.1	Die Bedeutung der Analysenzeit	44
4.2	Die mobile Phase	45
4.3	Die stationäre Phase	51
4.4	Der Einfluß der Temperatur	54
4.5	Die Gradientensteuerung	54
4.6	Die Wahl der geeigneten Wellenlänge	55
4.7	Die On-Column-Chelatbildung	57
4.8	Vorhergehende Anreicherung mit Einmaltrennsäulen	58
4.9	Vorkonditionierung mit Komplexbildnern	58

5.	Geräte zur HPLC	59
5.1	Programmierung	59
5.1.2	Timeprogram	
5.2	Fraktionssammler	60
5.3	Gradientensteuerung	60
6.	Verwendete Reagentien	61
7.	Extraktion	61
8.	Das 8-Hydroxychinolin	62
8.1	Komplexbindungs- und Extraktionsverhalten	62
8.1.1	Extinktionsmaxima und Extinktionskoeffizienten	
8.2	Die Verwendung des Oxins zur Chromatographie von Metallchelaten	63
8.3	Chromatographie der Cu-, Co- und Pb-Oxinate auf RP-Phasen	63
8.4	Diskussion	68
9.	Das 8-Mercaptochinolin	69
9.1	Komplexbindungs- und Extraktionsverhalten	69
9.2	Die Verwendung des Thiooxins zur Chromatographie von Metallchelaten	69

9.3	Das Hg-Thiooxin	71
9.4	Diskussion	76
10.	Das 2-Me-8-Mercaptochinolin	77
10.1	Extraktionsverhalten	77
10.2	Die Verwendung des 2-Me-Thiooxins zur Chromato- graphie von Metallchelaten	77
10.3	Zur Problematik der Cd-Bestimmung	78
10.4	Pb, Zn, As und Tl	79
10.5	Das Hg-2-Me-Thiooxin	80
10.5.1	Optimierung des Hg-Nachweises	
10.5.2	Eichkurven zur Bestimmung der Nachweisgrenze von Hg-2-Me-Thiooxin	
10.6	Diskussion	87
11.	Diskussion	88
	Zusammenfassung	89
Anhang I	Herstellung der mobilen Phase in der RP- HPLC mit Chelatzusatz	91
Anhang II	Darstellung des 2-Me-8-Mercaptochinolins	91
	1. Chemikalien	
	2. Synthese	
	Literaturverzeichnis	94

Einleitung

Während in den letzten Jahren zahlreiche Publikationen über die Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) organischer Substanzen veröffentlicht worden sind, gibt es nur relativ wenige Arbeiten über Schwermetallbestimmungen im Spurenbereich mit dieser Methode (Drasch, v. Meyer, Kauert (1982a,b/1983/1984); Heizmann (1973/1977); Lohmüller (1977); Mangia (1977); Schneeweis (1982); Schunk (1983/1984); Schwedt (1977/1978/1979a,b/1981); Steinbrech (1982); Tollinche (1978); Uden (1975a,b); Wenclawiak (1981/1982)).

Derzeit ist auf diesem Gebiet die Atom-Absorptions-Spektrophotometrie führend. Gegenüber der AAS hätte die HPLC aber eine Reihe von Vorteilen:

- Die Multielementanalyse in einem einzigen Arbeitsgang
- Die Wiederverwendbarkeit der Analysenproben
- Deren Fraktionierbarkeit und die Möglichkeit der weiteren Analyse durch die AAS etc.

Die HPLC stellt das kostengünstigere Verfahren dar und böte die Möglichkeit als Referenzmethode zur AAS zu fungieren.

Die HPLC ist jedoch im Gegensatz zur AAS im Bereich der anorganischen Analyse noch nicht allgemein anerkannt. Dies liegt vor allem an den bei der Chromatographie auftretenden Schwierigkeiten wie Tailing, schlechte Reproduzierbarkeit und störenden Absorptionseffekten (Schwedt (1977/1978/1979a,b)). Diese Mängel sind hauptsächlich bei Kieselgel-Phasen zu beobachten (Häring (1980)). Ein weiteres Problem ist der Mangel an geeigneten Chelatbildnern (Schneeweis (1982)).

Bei der Bestimmung von Schwermetallen mittels HPLC wurden bis jetzt vor allem Derivate der Diethyldithiocarbaminsäure (Drasch, v. Meyer, Kauert (1982c/1983); Heizmann (1977); Schwedt (1977/1978/1979a,b); Uden (1977)), der Diketonate (Huber (1972); Tollinche (1978)), der Dithizonate (Drasch, v. Meyer, Kauert (1982a); Lohmüller (1977); Ohai

(1982); Schwedt und Budde (1982)) und der Oxinate (Hoffmann (1982); Wenclawiak (1981/1982)) bevorzugt. Chromatographiert wurde mit Kieselgel- und Reversed-phase-Säulen (mit RP-Säulen arbeiteten Drasch, v.Meyer, Kauert (1982a,c); Hoffmann (1982); Mangia (1977); Schwedt (1977/1978/1979a); Tollinche und Risby (1978)).

Einen instruktiven Forschungsüberblick über die Entwicklung der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie der letzten 10 Jahre, die verwendeten Chelatbildner und die untersuchten Elemente, geben Schwedt (1979b) und O' Laughlin (1984).

In der vorliegenden Arbeit werden die theoretischen Grundlagen der Chelatbildung und der Chromatographie sowie die Bedeutung der verschiedenen chromatographischen Trennverfahren für die Analyse anorganischer Stoffe erörtert. In diesem Zusammenhang werden die verwendeten Chelatbildner charakterisiert und ihre Eignung für die Schwermetallbestimmung dargestellt.

Methoden zur Optimierung von Reversed-phase-Trennungen mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie werden aufgeführt.

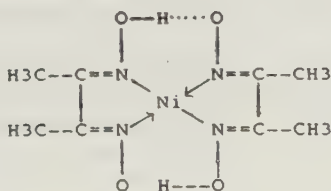
Das 8-Hydroxychinolin, das 8-Mercaptochinolin und das 2-Me-8-Mercaptochinolin werden auf ihre Verwendbarkeit zur Bestimmung von Arsen, Cadmium, Quecksilber, Thallium, Blei, Cobalt, Kupfer und Zink für die RP-HPLC untersucht.

2. Theorie der Komplexbildner

Die Bezeichnung Chelat wurde 1920 von Morgan und Drew eingeführt (griech. chele= Krebsschere). Chelate sind Verbindungen, in denen ein einzelner Ligand mehr als eine Koordinationsstelle an einem Zentralatom besetzt, so daß gestreckte Verbindungen nach Komplexbildung über ein Metall-Ion zu heterozyklischen Ringen geschlossen werden. Umland schreibt dazu (1971): "Enthält die mit Acceptor reagierende Substanz, der Ligand oder die Ligandgruppe, zwei oder mehr Atome mit Donatoreigenschaften, Ligandatome, so spricht man von einem Chelat, wenn bei der Reaktion ein oder mehrere Ringe gebildet werden. Der reagierende Ligand ist dann ein Chelatbildner."

Von der Koordinationszahl des zentralen Metalls ist die Zahl der gebundenen Liganden abhängig. Die Elektronen-Donatoren müssen einen bestimmten Mindestabstand von einander haben und am selben Zentralatom koordiniert sein.

Unter Zähigkeit versteht man die Zahl der an das selbe Zentralatom gebundenen Donatoratome. Einzählige Chelatbildner sind z.B. H_2O , OH^- , F^- und Hydrazin. Äthylendiamin, Dimethylglyoxim sind Beispiele für zweizählige Komplexbildner.



Nickeldimethylglyoxim
(aus Römpp 1973)

Der Ringschluß über Wasserstoffbrücken ist eine weitere Möglichkeit der Chelatbildung beim Nickeldimethylglyoxim.

Vor allem bei Hydroxycarbonsäuren, -ketonen und -aldehyden und 1,3-Diketonen kommt es zur Chelatbildung durch Wasserstoffbrückenbildung.

Die Chelatbildung wird in der Chemie hauptsächlich zur Maskierung, Metallrückgewinnung aus Lösungen und zur quantitativen Analyse angewendet. In der Medizin werden Chelate zur Entgiftung bei Schwermetallintoxikationen eingesetzt (Forth (1980)).

Durch den therapeutischen Einsatz von Komplexbildnern als Antidote soll eine Lösung von Metallen aus funktionell wichtigen Bindungsarten erreicht werden. Dies kann aber nur erreicht werden, wenn eine höhere Affinität zum Chelatbildner gegeben ist. Noch zirkulierende Metalle sollen durch Komplexbindung inaktiviert werden und deren Ausscheidung soll durch Harn oder Galle rasch erfolgen. Die Chelatbildung kann im Körper aber auch durch Aminosäuren und Proteine und körpereigene Metalle, wie z.B. Ca oder Zn erfolgen und zu Nebenwirkungen führen.

Tab.I

Komplexbildner	Indikationen	Dosierung	Nebenwirkungen
Dimercaprol (BAL)	As,Hg,Au+++ Antimon+ Wismut+ Tl o Pb,Se,Tellur-	3mg/kg i.m. 1.Tag 6xED. 2.Tag 5xED. 3.Tag 4xED. 4.-10. Tag je 2xED.	Erhöhung von Blutdruck, Herz- frequenz, Tempera- tur, Übelkeit, Nausea, Kopfschmer- zen, Parästhesien
Ca-Na2 - Äthylendiamin- tetraacetat (EDTA)	Pb+++ Cr,V,Mn,Pu+	20mg/kg in 200-500ml phys. Lsg o 5% Glucosel. 1.-5.Tag 2-3x	Nierenschäden Kopfschmerz Temperaturerhöh..
D- Penicillamin	Pb,Cu,Co,Au, Hg,Zn	2-4g per os	Nierenschäden

(+++ sehr gute, o keine Wirksamkeit, - kontraindiziert)

Tab.I Chelatbildner zur Therapie von Schwermetallvergiftungen nach Angaben aus Forth (1980)

Komplexbildner	Indikationen	Dosierung	Nebenwirkungen
Deferoxamin	Fe ++	2-10g per os od.i.v. 1-2g als I.	bei kurzer Anwendung keine
Dithiocarb	Ni		
Salicylsäure	Beryllium		

2.1 Komplexstabilität

Die Reaktion von Chelatbildnern (L) mit einem Metall (M) unterliegt dem Massenwirkungsgesetz. K ist hierbei die Stabilitäts- oder Komplexbildungskonstante. Sie ist ein Maß für die Stabilität des Metallchelates. Aus Gründen der besseren Handhabung und zur Vermeidung unübersichtlich großer Zahlenwerte wird K auch gerne als log K angegeben (s.Tab.II).

$$K = \frac{(M \times L)}{(M) \times (L)}$$

Tab.II

Stabilitätskonstanten (als logK) einiger Metalle nach Forth (1980) unter Verwendung verschiedener Chelatbildner.

Metall	EDTA	D-Penicill.	Deferoxamin
Mg ²⁺	8.7	-	4
Ca ²⁺	10.6	-	2
Mn ²⁺	13.4	5.6	-
Fe ²⁺	14.2	7.6	-
Co ²⁺	16.1	-	10

Metall	EDTA	D-Penicill.	Deferoxamin
Cd ²⁺	16.5	10.9	8
Pb ²⁺	18.2	13.0	-
Cu ²⁺	18.3	16.5	14
Ni ²⁺	18	11.1	11
Zn ²⁺	16	10.0	11
Fe ³⁺	25.0	-	31

Fortsetzung Tab.II

2.1.1 Einfluß des Zentralatoms auf die Komplexstabilität

Je nach Komplexbildungstendenz lassen sich die Kationen in verschiedene Gruppen unterteilen. Die folgenden Angaben stützen sich im wesentlichen auf Umlands "Theorie und praktische Anwendung der Komplexbildner"(1971).

2.1.1.1

Gruppe 1a: A-Kationen

Sie besitzen die Elektronenkonfiguration eines Edelgases.

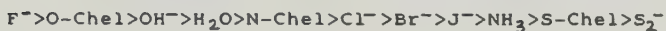
Li ⁺	Be ²⁺	B ³⁺			
Na ⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺			
K ⁺	Ca ²⁺	Sc ³⁺	Ti ⁴⁺	V ^V	Cr ^{VI}
Rb ⁺	Sr ²⁺	Y ³⁺	Zr ⁴⁺	Nb ^V	Mo ^{VI}
Cs ⁺	Ba ²⁺	La ³⁺	Hf ⁴⁺	Ta ^V	W ^{VI}
			Th ⁴⁺		U ^{VI}

Gruppe 1b: Lanthanoiden und Actinoiden

Sie verhalten sich wie A-Kationen.

Wenn man die Kationen als Lewis-Säuren und die Liganden als Lewis-Basen betrachtet, entsprechen die A-Kationen

nach Pearson (1963)(FN) den "harten Säuren". Sie bilden in wäßriger Lösung stabile Komplexe oder schwerlösliche Niederschläge mit F^- , H_2O , OH^- bzw. O_2^{2-} . Mit A-Kationen gehen Carbonat, Oxalat, Sulfat und Phosphat in Wasser schwerlösliche Verbindungen ein. Leichtlösliche stabile Komplexe bilden sich mit Weinsäure und Oxalsäure. Polyphenole, Acetylaceton und 8-Hydroxychinolin bilden schwerlösliche stabile Komplexe. Alle enthalten O als Ligandatom. A-Kationen sind ausnahmslos sauerstoffaffine Elemente. Für die Komplexbildneranionen läßt sich folgende empirische Stabilitätsreihe aufstellen:



FN

Nach Lewis (cit. n. Römpp (1973)) ist eine Säure eine Verbindung, die ein Elektronenpaar in die Valenzelektronenschale eines ihrer Atome aufnehmen kann (also ein Elektronen paar akzeptor), eine Base ist dementsprechend eine Verbindung, die ein freies Elektronenpaar besitzt (Elektronen paar donator). Nicht nur protonenabgebende Verbindungen (BRØSTED-Säuren), sondern z.B. auch Metall-Ionen und Neutralkomplexe sind zu den Säuren zu rechnen. Protonensäuren sind solche Protonendonatoren, die bei der Vereinigung der Lewis-Säure mit einer Lewis-Base und in einem geeigneten Lösungsmittel mit Bildung eines Anions und eines durch das Lösungsmittel solvatisierten Protons entstehen.

Pearson bezieht Metallsalze, Protonendonatoren und Lewis-Säuren in den Kreis der Säuren mitein, da sie mit Basen unter Aufhebung ihrer typischen Eigenschaften reagieren. Daraus folgt, daß damit sämtliche Komplexbildungsvorgänge und Fällungsreaktionen nichts anderes sind als verallgemeinerte Säure-Basen-Reaktionen.

Für Lanthanoiden und Aktinoiden gilt im wesentlichen das über A-Kationen Gesagte.

2.1.1.2

Gruppe 2a: B-Kationen

B-Kationen besitzen alle 10 bzw. 10+2 Elektronen in der bindenden Schale.

Cu ⁺	Zn ²⁺	Ga ³⁺	(Ge ⁴⁺)	(Ga ⁺)	(Ge ²⁺)	As ³⁺	
Ag ⁺	Cd ²⁺	In ³⁺	Sn ⁴⁺	(In ⁺)	Sn ²⁺	Sb ³⁺	Se ⁴⁺
Au ⁺	Hg ²⁺	Tl ³⁺	(Pb ⁴⁺)	Tl ⁺	Pb ²⁺	Bi ³⁺	Te ⁴⁺

Auch die B-Kationen bilden mit sauerstoffhaltigen Liganden Komplexe, die mehr oder weniger stabil sind. Der wesentliche Unterschied zu den A-Kationen liegt darin, daß Liganden wie NH₃, S₂²⁻, CN⁻ und die schweren Halogenidionen in der Regel H₂O, OH⁻ und O₂²⁻ leicht verdrängen können. Das gilt vor allem für Komplexbildner mit S und N als Ligandatome. B-Kationen sind sehr schwefel- und stickstoffaffin und geben stabile Chelate mit S-Liganden. Gegenüber N-Liganden und CN⁻ nimmt jedoch die Affinität von links nach rechts erheblich ab und vor allem die (10+2)-Untergruppe verhält sich gegenüber diesen Liganden weitgehend wie die A-Kationen.

Die Stabilität nimmt mit abnehmender Elektronennegativität des Ligatoms zu:



Diese Reihe gilt nach Umland (1971) allerdings nur mit Einschränkungen.

2.1.1.3

Gruppe 2b: Ü-Kationen (Übergangsmetallkationen)

Ti ³⁺	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu ²⁺
(Zr ³⁺)	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	(Ag ²⁺)
(Hf ³⁺)	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	(Au ²⁺)

Zu ihnen zählen alle mit der Elektronenzahl von 1 bis 9 über das nächst untere Edelgas hinaus (bzw. Hf (IV+) in der 6. Periode). Zahlreiche Wertigkeitsstufen treten auf. Deshalb sind nur die Wertigkeiten der ersten (mit einem Elektron) und der letzten Reihe (mit neun Elektronen) aufgeführt.

Da die Vielfalt der möglichen Oxidationsstufen das Bild sehr unübersichtlich gestalten, kann von einem typischen Verhalten der Ü-Kationen nicht gesprochen werden. Alle Ü-Kationen bilden, von Cr³⁺ und Fe, die stärkere O- als S- und N-Komplexe bilden und Ti³⁺, Nb, Ta abgesehen, schwerlösliche Sulfide und entsprechend stabile Chelate mit S-Liganden. Dies gilt besonders für die Platinmetalle, die außerdem noch sehr stabile Komplexe mit Phosphinen, also Chelaten mit P-Liganden, wie R₂P-CH₂-CH₂-PR₂ bilden. Phosphinochelate in der Gruppe der Übergangsmetalle und B-Kationen sind stabiler als Amin-Liganden.

2.1.2 Einfluß der Ligandatome auf die Komplexstabilität

Es lassen sich Ligandatome und Ligandgruppen unterscheiden. Als Ligandatome in Komplexen mit Kationen können nur die basischen Atome der Nichtmetalle fungieren.

H
2.1

C
2.5

N
3.0

O
3.5

F
4.0

P
2.1

S
2.5

Cl
3.0

As
2.0

Se
2.4

Br
2.8

Sb
1.9

Te
2.1

J
2.5

(Zahlen= Elektronegativität nach Pauling)

Hier läßt sich nach Pearson zwischen "harten Basen" (F,O) und "weichen Basen" unterscheiden. Die "Härte" der Base nimmt parallel der Elektronegativität von oben nach unten und weniger stark von rechts nach links ab. Die gebräuchlichsten Ligandatome sind, nach Basenstärke geordnet, $O > N > S$. Einzähnige Halogene sind keine Chelatbildner. Ähnlich verhält es sich mit C (bildet meist einzähnige Ligandgruppen wie CN^- und CO). Die analytische Anwendung von $Se > Te > P > As > Sb$ ist ebenfalls sehr begrenzt.

"Weiche Basen" bilden nur mit "weichen Säuren" stabile Komplexe. Zu den "weichen Säuren" zählen die B- und die Ü-Kationen. Zur Komplexstabilität läßt sich sagen, daß sie bei den "weichen Basen" (Schwefel) im Vergleich zu den "harten Basen" (Sauerstoff) zunimmt. So nimmt bei den B-Kationen die Stabilität der Komplexe von rechts nach links und von oben nach unten zu, während sie bei den Ü-Kationen von rechts nach links ab und von oben nach unten zunimmt.

Sidgwick (1927) verglich empirisch die Tendenz verschiedener Donatorgruppen zur Komplexbildung mit Metallen. Die von ihm aufgestellten Beziehungen gelten mit geringen

Einschränkungen auch für Chelate. Er teilte die Elemente bezüglich ihrer Affinität zu N und O als Donatoratome in 3 Klassen ein:

I O>N: Mg, Ca, Sr, Ba, Ga, In, Tl, Ti, Zr, Th, Si, Ge, Sn,
 V(V), Nb(V); Ta(V), Mo(V), U(IV), Fe(III), Co(II)

II O=N: Be, Cr(III), Fe(II), Platinmetalle

III N>O: Cu(I), Ag(I), Au(I), Cu(II), Cd, Hg, V(III),
 Co(III), Ni(II).

Klasse I ist mit den A-Kationen unter Einbeziehung der "härteren Säuren" der B-Kationen ,

Klasse III ist mit den Ü-Kationen und den "weichen Säuren" der B-Kationen identisch.

Der Vergleich von O und S als Ligandatome ist problematischer. Die empirische Reihe nach Sidgwick (1927) lautet:

O>S: Be, Cu(II), Au(III) und die meisten anderen Metalle

S>O: Cu(I), Ag(I), Au(I), Hg(I)

Bei der Übertragung auf die Chelatbindungen ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Koordinationsfähigkeit des S sich bezüglich der Substitution



umgekehrt wie O und N verhält.

2.1.3 Einfluß der Ligandgruppen auf die Komplexstabilität

Da es sich bei Chelatbildnern um organische Moleküle handelt, stehen für die Änderung ihrer chemischen Struktur viele Substituenten zur Verfügung. Mit ihnen kann man die

Stabilität des Komplexes gezielt variieren. Für die Veränderung der Stabilität sind nach Umland (1971) folgende Eigenschaften der Ligandgruppen entscheidend:

- Räumliche Struktur der Ligandgruppe und des Komplexes
- Ionen- oder Atomradius bzw. Art des Ligandatoms
- Dissoziationsgrad des Komplexes bzw.
- Protonisierungs- oder Deprotonisierungsgrad des Chelatbildners
- Dipolmoment
- Polarisierbarkeit

Die geringste Rolle spielen hierbei Polarisierbarkeit und Dipolmoment. Protonisierungs- und Deprotonisierungsgrad haben eine gewisse Bedeutung bei der Chelatbildung aus wässriger Lösung. Auch eine Auswahl nach Art der Ligandatome läßt nur eine begrenzte Differenzierung der Chelatstabilität zu. Die größte Bedeutung hat die Änderung der räumlichen Struktur der Ligandgruppen und der Chelate.

Die Selektivität und Spezifität der Chelate läßt sich sowohl durch Erhöhung wie auch durch Verminderung der Stabilität erhöhen. Ziel ist immer eine größere Differenz der Stabilitätskonstanten. Diese werden unter anderem beeinflusst durch (Umland (1971)):

- Wertigkeitsänderung des Kations
- Wechsel der Koordinationszahl
- andere Kationen
- Wechsel der Art der Ligandatome
- Veränderung der Protonenaffinität
- Veränderung der Koordinationsfähigkeit

Die Stabilität wird verändert durch Variation der:

- Ringgröße
- Anzahl der Ringe
- Substitution in der Ligandgruppe

Sie wird erhöht, wenn der Chelatring ein resonanzfähiges Mesomeriesystem ausbilden kann, erniedrigt durch sterische Hinderung, wenn räumlich ausgedehnte Gruppen in unmittelbarer Nachbarschaft stehen.

Außerdem führen nucleophile Substituenten (z.B. Methylgruppen) durch ihre elektronenschiebende Wirkung zu einer Erhöhung der negativen Ladung und damit zu einer Erhöhung der Donatorstärke an den Ligandatomen. Sie erhöhen die Stabilität eines Metallchelates, da mit steigender Negativität des Elektronenpaares, d.h. mit Erhöhung der Verfügbarkeit am Donatoratom, die kovalente Bindung mit dem Metall stärker wird. Elektrophile Substituenten (z.B. Phenyl und NO_2) erreichen durch ihre elektronenziehende Wirkung eine Positivierung der Ligandatome und damit eine Abnahme der Donatorstärke. Sie verringern die Metallchelastabilität.

Durch Substitution in der Ligandgruppe erreicht man eine:

Änderung der Basizität der Ligandatome

Änderung der Resonanzeigenschaften der Chelate

sterische Hinderung

2.1.4 Einfluß der Ringgröße und der Ringzahl

Zunehmende Ringgröße führt zur Erniedrigung des Entropieanteils an der Chelatbildung. Abnehmende Ringgröße führt zu einer Erhöhung der Ringspannung. Höchste Stabilität liegt bei kleinen, gerade noch spannungsfreien Ringen vor (Umland (1971)).

Chelat-3-Ringe sind wegen ihrer hohen Ringspannung nicht stabil. Instabil sind ferner alle Chelate mit mehr als 6-Ringen.

Chelat-4-Ringe sind zum Teil schon sehr stabil. Sie werden bevorzugt mit S,S oder S,N, seltener mit S,O-Liganden von B- und Ü-Kationen gebildet. Die bekanntesten Chelat-4-Ringe sind die Dithiocarbamate.

Die meisten B-, O- und die größeren A-Kationen bilden stabile Chelat-5-Ringe aus. Alle Kombinationen der Ligandatome O,N,S kommen vor. Außerdem treten Doppelbindungen auf. Zu den Chelat-5-Ringbildern gehören z.B. das 8-Hydroxychinolin (Chelatringgruppierung: $O-C=C=N$), das 8-Mercaptochinolin (Chelatringgruppierung: $N=C-C-S$) und das Diphenylthiocarbazon (Crg.: $N=N-C-S$).

Chelat-6-Ringe sind fast ebenso häufig wie Chelat-5-Ringe. Sie sind aber im wesentlichen auf O,O und O,N als Ligandatome beschränkt. Zu ihnen zählen die β -Diketone, z.B. Acetylaceton, ein Breitbandkomplexbildner oder Benzoylaceton (Crg.: $O=C-C=C-C=O$).

2.2 Löslichkeitseigenschaften der Chelate

Die Löslichkeit eines Stoffes wird bestimmt durch die Größe der

Gitterenergie und der Solvationsenergie

Über erstere läßt sich sehr wenig aussagen. Sie dürfte aber den Chelaten ähnlicher Struktur vergleichbar sein. Die Solvationsenergie hängt ab von der:

Ähnlichkeit des Chelates mit dem Lösungsmittel

Ladung

Polarisierbarkeit

Größe des Moleküls.

Die Löslichkeit von Chelaten in polaren oder unpolaren Lösungsmitteln wird verändert durch:

hydrophobe (aliphat. und aromat. Kohlenwasserstoffreste)

hydrophile ($-SO_3$, $-PO_3$, $-AS_3$, $-COO$) Gruppen

Art und Ladung von Kationen und Liganden

synergetische Effekte (z.B. Austausch von H_2O durch ROH).

Ionenpaarbildung

Hydrophile Gruppen machen Chelatbildner wasserlöslich. Bei der Chelatbildung werden die hydrophilen Gruppen der Liganden durch die Bindung an das Metallatom abgesättigt. Das Chelat ist dann schwerer in Wasser löslich als der Chelatbildner, wenn keine weiteren hydrophilen Gruppen vorhanden sind und wenn die organischen Gruppen genügend groß und hydrophob sind, um eine Solvation durch Wasser zu verhindern.

Mit zunehmender Größe der hydrophoben Gruppen nimmt die Löslichkeit in unpolaren organischen Lösungsmitteln zu. Eine gute Löslichkeit besitzen Chelate mit restlichen hydrophilen Gruppen in polaren organischen Lösungsmitteln wie Alkoholen, Ketonen, Ester und Äther. Restliche hydrophobe Gruppen führen zu guter Löslichkeit der Chelate in organischen Lösungsmitteln mit geringem Dipolmoment wie CHCl_3 . Schlechter löslich sind sie bei Verwendung völlig unpolarer Mittel wie CCl_4 (Umland (1971); Steinbrech (1982)).

2.3 Optische Eigenschaften der Chelate

Die Farbigkeit vieler Chelate wird zur photometrischen Bestimmung ausgenutzt. So liegt z.B. das Extinktionsmaximum nach Koch/Koch-Dedic (1974) bei Verwendung von 8-Hydroxychinolin in CHCl_3 für Cd bei 380nm, Fe(III) bei 470/570nm, Hg(I) bei 395nm, Ni 395nm, Pb 400nm, Tl(III) 400nm und für Zn bei 370nm.

Der Extinktionskoeffizient bei Metallchelaten hängt von der Art des Zentralatoms und der Art des Liganden ab. So führt in der Regel der Ersatz von O durch S oder Se als Ligandatom bei intensiverer Eigenfärbung zu einer erhöhten Lichtabsorption und einem Anstieg des Extinktionskoeffizienten um den Faktor 2 bis 3. Dieser liegt bei farbigen Metallchelate liegt zwischen 10.000 und 70.000. Er ist um so höher, je mehr ein konjugiertes π -System delokalisiert ist. Nur sehr wenige Chelate erreichen jedoch den theoretischen Wert von $\epsilon = 100.000$ je Elektronenübergang.

Das Absorptionsmaximum liegt in der Regel zwischen 200nm und 470nm. In diesem Bereich treten vor allem $n \rightarrow \pi^*$ und $n \rightarrow \pi^*$ Übergänge auf. FN Bei S-, P-, Se-Ligandatome und Ü-kationen kommen auch Übergänge von Elektronen in d- und f-Schalen vor.

FN cit.nach Römpp (1973)

Als ein Beispiel für n, π^* Übergang, in dem ein n - Elektron, das sich vorher bevorzugt am O-Atom aufgehalten hat, in ein π^* - Orbital gehoben wird, kann die Anregung des Acetons mit Licht der Wellenlänge 280nm angesehen werden.



In dem angeregten Zustand werden die nicht-bindenden n - Elektronen der Carbonyldoppelbindung entkoppelt. Bei ungesättigten Verbindungen wie Alkenen spricht man analog von π, π^* - Übergängen. Bei ungesättigten Ketonen handelt es sich sowohl um n, π^* , als auch um π, π^* Anregungen, die jeweils bei verschiedenen Wellenlängen der Einstrahlung stattfinden.

2.4 Kriterien für die Beschaffenheit geeigneter Metallchelate für die Chromatographie

- Der Ligand sollte mit dem Zentralatom einen 5-gliedrigen Ring ausbilden. Dieser hat eine höhere Stabilität und Breitbandigkeit als 4- und 6-Chelatringe.FN
- Die Selektivität des Komplexbildners soll durch pH-Änderungen und Maskierungsreagentien steuerbar sein.
- Als Ligandatome kommen vor allem N, O, S und Se in Frage.
- Die Chelatbildung soll in wässriger Lösung erfolgen.
- Die Extraktion in die organische Phase soll vollständig sein.
- Der Chelatring sollte ein konjugiertes π - System ausbilden ($\rightarrow$ Erhöhung der Komplexstabilität) und dieses sollte weiter über den Liganden delokalisiert sein ($\rightarrow$ höhere Extinktionskoeffizienten).

FN

Eine Ausnahme stellen hier allerdings die Dithiocarbamate dar, die ein 4-Ring-System ausbilden und sich durch ihre hohe Stabilität auszeichnen.

3. Theorie der Chromatographie

Die erste Veröffentlichung, die als ein Beispiel für Flüssigkeitschromatographie angesehen werden kann, geht auf M. Tswett (1903), geboren 1872 in Asti (Italien), zurück. Er berichtete 1903 während seiner Tätigkeit als Chemiker in Rußland von der Trennung grüner Pflanzenpigmente durch eine mit pulverisiertem Kalk gefüllte Säule. Die Trennung dauerte jedoch sehr lange - Strömungsgeschwindigkeit $< 60 \text{ ml/h}$ pro cm^2 Säulenquerschnitt -, da die mobile Phase nur der Schwerkraft folgend durch die Säule strömte.

Den nächsten Fortschritt in der Flüssigkeitschromatographie erzielten Martin und Synge, wofür sie den Nobelpreis erhielten (1941).

Die lange Dauer der Analysen und die unbefriedigende Trennleistung, die durch die Überladung der Trennsäulen mit Probenmaterial bedingt war, führten dazu, daß die Säulenchromatographie von der Papier- und Dünnschichtchromatographie auf vielen Anwendungsgebieten weitgehend verdrängt wurde.

Durch die Einführung der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, die mit erhöhten Eingangsdrücken bis zu 400 at arbeitet und der Verwendung dünnerer Trennsäulen, die einen Durchmesser von 2mm bis 6mm (früher $> 1 \text{ cm}$) aufweisen, die mit Teilchen gepackt sind, deren Durchmesser $< 50 \mu\text{m}$ beträgt (früher $> 100 \mu\text{m}$), haben sich die Möglichkeiten der Säulenchromatographie entscheidend verbessert.

Die Trennung in der Chromatographie beruht auf physikalisch oder chemisch unterschiedlichen Eigenschaften der Probenbestandteile, die durch zwei nicht mischbare Phasen - die stationäre und die mobile Phase - wandern. Die Geschwindigkeit mit der sich die Probenmoleküle in der mobilen Phase bewegen, ist abhängig vom Verteilungskoeffizienten zwischen mobiler und stationärer Phase. Daraus folgt, daß diejenigen Analysenbestandteile, die eine größere Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der stationären als in der mobilen Phase haben, langsamer wandern als jene, die sich hauptsächlich in der mobilen Phase aufhalten.

3.1 Die Trennverfahren und ihre Bedeutung für die Chromatographie von Metallchelaten

Grundsätzlich lassen sich zwei verschiedene Systeme nach Art der unterschiedlichen mobilen Phase unterscheiden. Die mobile Phase kann ein Gas sein (Gaschromatographie) oder eine Flüssigkeit (Flüssigkeitschromatographie).

Die stationäre Phase kann fest (Adsorptionschr.) oder flüssig sein. Haftet eine Flüssigkeit als stationäre Phase auf einem inaktiven festen Träger, so wird dies als Verteilungschromatographie bezeichnet.

Engelhardt (1975) gibt je nach Molegewicht den Einsatzbereich der chromatographischen Verfahren an.

Ausschlußchromatographie _____

Flüssigkeitschromatogr. -----

Gaschromatographie -----

1	10	100	1K	10K	100K	1000
(Molegewicht)						

3.1.1 Gaschromatographie

Für die Gaschromatographie ist eine Voraussetzung die, daß sich die zu untersuchenden Proben zersetzungsfrei verdampfen lassen. Mit ihr trennt man hauptsächlich flüchtige Stoffe mit einem Molgewicht kleiner 1000. Die mobile Phase ist in der GC ein inertes Gas, welches die sich in Dampf-form befindlichen Stoffe durch eine flüssige (Gas-Verteilungschrom.) oder eine feste Phase (Gas-Adsorptionsschrom.) transportiert. Einen Überblick über die Gaschromatographie von Metallchelaten gibt Schwedt (1981).

Als Metallchelatbildner werden die β -Diketonate, β -Thio-ketone, β -Ketoamine, Dithiocarbamate, Diethyldithiocarbamate und Dithiophosphate eingesetzt.

Probleme entstehen jedoch durch mangelnde Stabilität der Chelate.

Mit dem Natrium-diethyldithiocarbamat konnten Drasch, v.Meyer und Kauert (1982b) mit optimierenden Methoden die Nachweisgrenze für Cd bis auf 50pg senken.

3.1.2 Flüssigkeitschromatographie

Im Unterschied zur GC wird die Flüssigkeitschromatographie zur Trennung von nicht unzerstört verdampfbaren Substanzen verwendet.

Nach dem Trennmechanismus kann man zwischen Verteilungs-, Adsorptions-, Reversed-phase-, Ionen-Austausch- und Gel-Chromatographie unterscheiden.

3.1.2.1

Bei der Verteilungschromatographie verwendet man als Trägermaterial Aluminiumoxid, Kieselgel, silanisiertes Kieselgel, Cellulose, Glaspulver und Polyamid. Diese werden mit Wasser als stationäre Phase belegt. Als mobile Phase dienen mit Wasser nicht oder nur beschränkt mischbare

Lösungen von Alkoholen, Ketonen, organischen und anorganischen Säuren.

Die VC ist für die Chromatographie von Metallkomplexen von untergeordneter Bedeutung. Bei der HPLC wirkt sich auch nachteilig aus, daß hier die mobile mit der stationären Phase gesättigt sein muß, da sich sonst der Flüssigkeitsfilm vom Trägermaterial ablöst. Dies ist auch der Grund dafür, daß sich keine schnellen Gradienten fahren lassen. Es würde sich das System mobile/stationäre Phase verändern.

Als erste berichteten Huber et al. (1972) über die Chromatographie von Be-, Fe-, Co-, Ru-, Cu- und Al-Chelaten mittels 1,2-Diketonen bei 310nm Wellenlänge. Über die Detektionen von Cr und Fe folgten Arbeiten von Greenwood et al. (1972) und Eberhard et al. (1973).

3.1.2.2

Die Reversed-phase Chromatographie kann zur VC gerechnet werden. Hier ist die stationäre Phase unpolar, die mobile Phase polar. Nach Art der Trägermaterialien unterscheidet man alkylierte (Kohlenstoffketten: C18, C8 oder C2) von anorganischen oder organischen Substanzen wie Alkylphosphaten, Nitrilen, Polyglykolen oder Chelatbildner wie Dithizon, Oxin und Dithiocarbamat, die an die Trägermaterialien der Säulen, deren Oberflächen aus Kieselgel oder Zellulose bestehen, gebunden werden und damit die Säulen hydrophob einstellen.

Bei der RP-Chromatographie ist Wasser die schwächste mobile Phase. Bei einem Anstieg des Wasseranteils erhöhen sich die Retentionszeiten. Die Vorteile der RP-Materialien liegen in der schwächeren elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Probenmolekül und stationärer Phase und der schnelleren Gleichgewichtseinstellung zwischen mobiler und stationärer Phase, was bei einem Lösungsmittelwechsel oder einer Gradientensteuerung von Vorteil ist. Dies ist auch der Grund für die bessere Konditio-

nierbarkeit der RP- gegenüber den Normal-Phasen. Dieser weitverbreiteten Auffassung widerspricht allerdings Schneeweis (1982).

Zur Chromatographie von Cu, Ni und Pb benutzten Uden, Pares und Walters (1975a) β -Ketoamine. Die Detektion erfolgte bei 254nm.

Mangia et al. (1977) verwendeten Kronenäther zur Darstellung von Hg.

Tollinche und Risby (1978) untersuchten verschiedene Säulen zur Chromatographie von Cu, Co, Cr, Al, Be, Ru, Rh, Fe und Ni mit β -Diketonaten. Dabei gaben sie den Normalphasen den Vorzug.

Die Diethyldithiocarbamate (DDTC) wurden von Schwedt (1977) mittels einer RP-8 Säule zur Darstellung von Se, Pb, Ni, Cu und Cr, Co, Pb, Cu und Hg (1978) verwendet. Dabei stellte sich die gute Eignung von DDTC zur Analyse von Co, Ni, Hg, Pb und Cu bei einem Fließmittelgemisch aus Acetonitril bzw. Methanol/Wasser heraus. Die Komplexe von Cd, Zn, As, Sb, Be, Su und Ag zeigten Zersetzung.

Mit dem Tetramethyldithiocarbamat fand Schwedt (1979a) auch einen geeigneten Komplexbildner für die RP-HPLC von Cd, Ni, Co, Cu und Hg. Er verwendete RP-8 bzw. RP-18 Säulen und detektierte bei 254nm. Der Austausch von Methanol durch Acetonitril in der mobilen Phase führte zu einer Verringerung der Selektivität der RP-8 Säulen. Dies war jedoch nicht auf RP-18 Phasen zu beobachten.

Hoffman und Schwedt (1982) trennten Mn(II), Mn(III) und Co, Zn, Cu und Al mit β -Hydroxychinolin, indem sie die Chelatbildung erst in der Säule stattfinden ließen. Als stationäre Phase dienten RP-8 und RP-18 Säulen, als mobile Phase ein Methanol/Wasser-Gemisch (60:40) mit geringem Zusatz von Chelatbildner. Damit wollten sie das von ihnen beobachtete Phänomen der Änderung der Oxidationsstufe - diese kann ein Grund für mehrere Peaks sein - durch Reaktion des Metallkomplexes mit Luft während der Derivatisierung verhindern.

Die Abhängigkeit der Chelatbildung vom pH-Wert untersuchten Schwedt und Budde(1982). Sie chromatographierten Cu, Ni und Co unter Verwendung von RP-2 Säulen mit Dithizon als Chelatbildner. Die mobile Phase bestand aus Acetonitril/Wasser/Citrat-Puffer (80:18:2) mit einem pH von 5.

Die Komplexbildung mit der On-Column- Methode nach Berthod (1979), bei der die Chelatbildung erst in der Säule stattfindet, erprobten neben Hoffman und Schwedt (1982), die mit Oxin Co, Mo, Mn(II) und Mn(III) chromatographierten, auch Smith und Yankey (1982). Sie trennten Cu, Co, Pb und Cd(II) mit einer mobilen Phase aus Methanol/Wasser (75:25) unter Zugabe von 0,05% NaDDTC.

Ohahi et al. (1982) wiesen 5.2ng bis 30ng Co(II) in einem Gemisch von Ni, Zn, Pb und Cd bei einer Wellenlänge von 550nm nach. Sie benutzten Dithizon als Komplexbildner. Den pH stellten sie auf 8.5 ein. Methanol/Wasser im Verhältnis 85:15 diente als mobile Phase.

Mit Na-DDTC und RP-18 Glassäulen erreichten Drasch, v. Meyer und Kauert (1982c) bei einer Wellenlänge von 270nm für Cd und Pb eine Nachweisgrenze von 2ng und 5ng. Ni, Cu, Pd, Zn, Tl, Co und Hg ließen sich ebenfalls trennen. Eine Verbesserung der Peakform erreichten sie durch Zugabe von Chloroform zu Methanol/Wasser-Gemischen. Das optimale Verhältnis war 60:32:8 (H₂O/MeOH/CHCl₃).

Drasch et al. (1982a) chromatographierten mit Dithizon Pd, Hg und Co auf RP-C8 Säulen. Die Wellenlänge war für Hg 488nm. Ein Lösungsmittelgemisch aus Aceton/Methanol/Wasser (33,5:33,5:33) kam zur Anwendung. Die Nachweisgrenze lag für Hg-Dithizon bei 5ng. Mit Hexamethylenammonium-Hexamethyldithiocarbamat unter Verwendung von Methanol/Wasser/Chloroform stellten sie Pd, Hg, Co und As dar. Letzters erwies sich als nicht besonders stabil..

Steinbrech (1982) verwendete das 1-Hydroxy2-Pyridinthion mit RP2/8/18 Säulen zur Detektion von Co und Cu. Als mobile Phase nahm er Methanol/Wasser/Tetrahydrofuran (50:40:10). Die Wellenlänge betrug 320nm. Andere Metallchelate ließen sich nicht chromatographieren.

3.1.2.3

Für die stationäre Phase bei der Adsorptionschromatographie werden hauptsächlich Kieselgel oder Aluminiumoxid verwendet. Die mobile Phase umgibt die stationäre. Geht das Probenmolekül eine stärkere Wechselwirkung mit der stationären Phase ein, so verdrängt es die mobile Phase. Als Lösungsmittel finden Wasser oder wässrige Lösungen mit Basen, Salzen, Alkoholen, Kohlenwasserstoffen etc. Anwendung.

Die unterschiedliche Adsorption der polaren Gruppen der Probenmoleküle an der Oberfläche der stationären Phase führt zur chromatographischen Auftrennung, wobei folgende Wechselwirkungen nach Römpp (1973) auftreten können:

- Dipol-Dipol
- Dipol-induzierter Dipol
- Wasserstoffbrückenbindung
- π -Komplexbindung

Das Probenmolekül kann nur dann das Lösungsmittelmolekül verdrängen, wenn seine Wechselwirkung mit dem Adsorbens stärker ist. Je nach Polarität besetzen die Lösungsmittelmoleküle die aktiven Zentren in der stationären Phase unterschiedlich schnell. Für die Polarität der Lösungsmittel läßt sich nach Snyder (1968) eine elutrophe Reihe aufstellen:

s.S. 33 Tab.III (ergänzt mit Angaben aus Engelhardt (1975))

Zu den ersten, die mit Diacethyl-bis-thiobenzhydrazon Zn, Cu, Pb und Hg auf Si (Kieselgel) 60 Säulen darstellten, gehören Heizmann und Ballschmiter (1973). Sie verwendeten Benzol als mobile Phase und konnten 2ng Hg und 500ng Cu photometrisch bestimmen. Unter Verwendung der Gradientenelution verkürzten sie die Retentionszeiten. In einer weiteren Arbeit berichteten sie (1977) über die

Trennung von Pb, Zn, Cd, Hg, Cu, Ni und Co mit 1,2-Diketo-bis-thiobenzhydrazon-Dialkyldithiocarbamaten und 1,2-Diketo-bis-thiosemicarbazonen als Komplexbildner.

Uden et al. (1975) trennten unter Verwendung von N,N'-Ethylen-bis-acetylaceton Cu und Ni. Sie benutzten eine Wellenlänge von 254nm und erreichten eine Peakflächen-linearität über den Bereich von 25ng bis 240µg.

Uden und Bigley (1977) führten einen Co- und Ni-Nachweis mit Linearität von 5 bis 500ng durch und konnten Cu ab 10ng bis 500ng detektieren. Als Chelatbildner fungierte DDTc. Bei einer Wellenlänge von 254nm wurde gemessen.

Tab.III Elutrope Reihe

Lösungsmittel	a	b	c	d
CCl4	0.18	2.24	0.97	265
Toluol	0.29	2.38	0.59	290
Benzol	0.32	2.28	0.65	290
Chloroform	0.40	4.8	0.57	250
Thf	0.45	7.58	0.46	220
Aceton	0.56	21.4	0.32	330
Acetonitril	0.65	37.5	0.37	210
Äthanol	0.88	25.8	1.2	200
Methanol	0.95	33.6	0.6	200
Wasser		80.4	1.00	180

a= Lösungsmittelstärke

b= Dielektrizitätskonstante

c= Viskosität η (20°C)

d= Niedrigste verwendbare Wellenlänge

Für RP-Phasen gilt die elutrope Reihe in umgekehrter Richtung. Wasser ist hier das schwächste Elutionsmittel.

Lohmüller et al. (1977) trennten Pb, Zn, Cd, Hg, Cu, Ni und Co mit Dithizon. Sie verwendeten eine Wellenlänge von 525nm und Si 60 Säulen. Als mobile Phase wurde Benzol verwendet. Cd ließ sich allerdings nur mit einem polareren Fließmittel darstellen; es trat starkes Tailing auf.

Wenclawiak (1981/1982) berichtete von einer Chromatographie der V, Cr, Mo, W und Co-8-Hydroxychinoline mit Si 60 Phasen. Als Fließmittel benutzte er Tetrahydrofuran/Chloroform (60:40). Bei einer Wellenlänge von 254nm erreichte er eine Nachweisgrenze zwischen 0,5ng (Co) und 1,5ng (W).

Mit dem 1-Hydroxy-2-Pyridinthion gelang Steinbrech (1982) die Darstellung von V, Cr, Mo, Mn, Co, Ni, Pd, Rh, Ir, Pt, Cu und Te. Er verwendete Si 100 Säulen und als mobile Phase verschiedene Fließmittelkombinationen. Bevorzugt wurde Methanol/Tetrahydrofuran (10:90 bzw. 90:10). Die Detektion erfolgte bei 320nm.

3.1.2.4

Bei der Ionenaustauschchromatographie verwendet man organische Polymere, die mit endständigen Sulfonsäure- oder Acetatgruppen (Kationenaustauscher) oder mit Trialkylammoniumgruppen (Anionenaustauscher) kombiniert sind. Die Trennung beruht auf Differenzen in der Affinität verschiedener Ionen gleichen Ladungssinnes gegenüber Ionenaustauschern. Nach Römpp (1973) beeinflussen hydratisierte Metallionen die elektrostatischen Anziehungskräfte, die für die Bindungsfestigkeit an die funktionellen Gruppen der Austauscher verantwortlich sind.

Lanthaniden, Actiniden und Alkalimetalle können getrennt werden.

Kettrup et al. (1981) berichteten von einer Hg- Bestimmung bis ca. 8µg/ml bei einer Wellenlänge von 530nm und von einer Ag- Detektion bis 2,6µg/ml bei einer Wellenlänge von 540nm unter Verwendung von Nitroformazan.

Weitere Literaturangaben finden sich bei Schwedt (1979).

3.1.2.5

Bei der Ausschlusschromatographie treten keine Wechselwirkungen zwischen Probe und stationärer Phase auf. Durch die unterschiedlichen Molekülgrößen ergeben sich differente Wandergeschwindigkeiten der Probenmoleküle. Kleine Moleküle diffundieren in die Poren des Gels und werden deshalb verzögert durch die Säule wandern, während Moleküle, deren Durchmesser den der Poren überschreitet, schneller transportiert werden. Die Ausschlusschromatographie dient zur Trennung von Substanzen verschiedenen Molekulargewichts.

Für die Metallchelatchromatographie hat sie nur untergeordnete Bedeutung. In diesem Rahmen sei nur die Bestimmung von Co und Cr durch Saitoh et al. (1974) mit Acetylacetonat und die Chromatographie von Cr mit β -Diketon von Suzuki und Saitoh (1977) erwähnt.

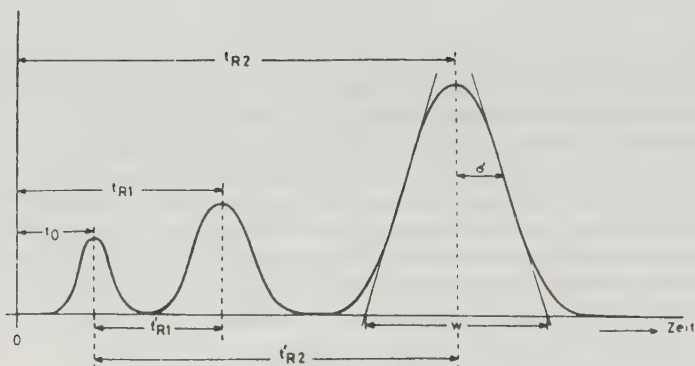
3.2 Retention

Eine der wichtigsten Begriffe der Chromatographie ist die Retentionszeit. Sie ist unabhängig von der Probenmenge und steht im direkten Zusammenhang mit dem Verteilungskoeffizienten. Dies ist eine Grundbedingung für die qualitative Bestimmung von Probelösungen.

Die Retentionszeit t_R setzt sich zusammen aus der Aufenthaltszeit der Probe in der mobilen Phase, genannt Totzeit t_0 - sie ist für alle Stoffe gleich - und der stationären Phase t'_R .

$$t_R = t_0 + t'_R$$

Hierzu eine Abbildung aus Engelhardt: "Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie" (1975).



t_0 = Totzeit der Trennsäule (Elutionspeak einer nicht retardierten Substanz)

$t_{R1}, t_{R2} \dots$ = Retentionszeit der Komponenten 1, 2, ...

$t'_{R1}, t'_{R2} \dots$ = Nettoretentionszeit der Komponenten 1, 2, ...

w = Basisbreite des Peaks (Schnittpunkt der Wendetangente mit der Null-Linie = 4σ)

σ^2 = Varianz der Gauß-Kurve

Durch die Einführung des Retentionsvolumens V_R , wird berücksichtigt, daß die Retentionszeit t_R von der Strömungsgeschwindigkeit des Eluenten F abhängig ist.

$$V_R = t_R \times F \text{ (in cm /min)}$$

t_0 kann durch eine Substanz bestimmt werden, die nicht in der Säule zurückgehalten wird. Jinno et al. (1983) schlugen zur Berechnung der Totzeit in der RP-HPLC Natriumnitrit und Natriumnitrat vor. Als Fließmittel wählten sie Acetonitril/Wasser (60:40) und als Wellenlänge 207nm.

Das Totvolumen V_M des gesamten Systems (Säule+ Weg von Einspritzung bis zum Detektor) ist dann:

$$V_M = t_0 \times F$$

Aus $V_R - V_M$ ergibt sich das Netto-Retentionsvolumen V_N , welches dem Volumen der stationären Phase V_S proportional ist.

$$V_N = V_S \times k$$

k ist hier der Verteilungskoeffizient

Diesem ist k' , welches als Massenverteilungsverhältnis bezeichnet wird, proportional.

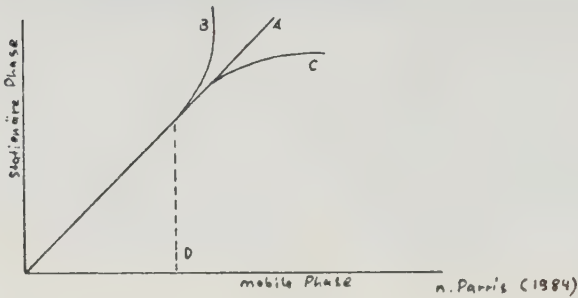
$$k' = k \frac{V_S}{V_M}$$

$$k' = \frac{\text{Masse in stationärer Phase}}{\text{Masse in der mobilen Phase}}$$

$$= \frac{\text{Konzentration in der s.P.}}{\text{Konzentration in der m.P.}} \times \frac{\text{Volumen der s. P.}}{\text{Volumen der m. P.}}$$

Da k' unabhängig von der Säulenlänge und bei Eluentengeschwindigkeiten unter 5cm/sec in der Flüssigkeitschromatographie auch unabhängig von der Geschwindigkeit der mobilen Phase ist, befindet man sich bei konstanten äußeren Bedingungen nach Engelhardt (1975)

im linearen Bereich der Isotherme. Nur hier ist Chromatographie reproduzierbar.



A = linear

B = konkav

C = konvex

D = Grenze des linearen Vertrauensbereiches

Bei konstanter Strömungsgeschwindigkeit kann anstatt der Volumina V_S/V_M auch die Retentionszeit und die Totzeit zur Berechnung von k' verwendet werden.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Da $t_R = t_0 + t'R$ lässt sich weiter vereinfachen:

$$k' = \frac{t'R}{t_0}$$

Aus den vorangegangenen Gleichungen folgt auch die Abhängigkeit der Retentionszeit t_R (und damit auch der Peakbreite) von:

1. der Säulenlänge
2. der Geschwindigkeit der mobilen Phase (= Flow)
3. dem Massenverteilungsverhältnis (also der Differenz der Aufenthaltszeiten der Probe in mobiler und stationärer Phase)

3.3 Selektivität

Die Selektivität einer Säule wird durch die relative Retention, die die Beziehung zweier Massenverteilungsverhältnisse darstellt, bestimmt.

$$\alpha = \frac{k'2}{k'1}$$

Da auch gilt:

$$\alpha = \frac{tR'2}{tR'1}$$

wird klar, daß die Trennung zweier Substanzen um so besser gelingt, je größer die Differenz der Aufenthaltszeiten der einzelnen Proben in der stationären Phase ist. Ist die relative Retention = 1 bedeutet dies, daß zwei Substanzen nicht getrennt werden können, da sie sich thermodynamisch nicht von einander unterscheiden.

3.4 Bandenverbreiterung

Als Maß für die Bandenverbreiterung dient die Bodenhöhe h .

$$h = \frac{\sigma^2 L}{L}$$

σ^2 = Varianz

L = Säulenlänge in cm

Benutzt man die Gleichung

$$h = \frac{L}{16} \times \left(\frac{W}{tR} \right)^2$$

läßt sich die Bodenhöhe h direkt aus dem Schreiber-

diagramm ableiten, da sich w aus der Basisbreite zwischen den Wendetangenten ablesen lässt (entspricht 4 σ).

Analog dazu wurde die Bodenzahl n eingeführt. Sie ist der Säulenlänge proportional.

$$n = \frac{L}{h} = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

Da h und n aber nicht das Massenverteilungsverhältnis k' berücksichtigen, welches entscheidend für die Trennung von Substanzen ist, wurde die effektive Bodenhöhe bzw. -zahl eingeführt. Sie stellt eine Konstante dar.

$$H = h \times \frac{(1+k')^2}{k'^2} = \frac{L}{16} \times \left(\frac{w^2}{t'^2 R} \right)^2$$

$$N = n \times \frac{k'^2}{(1+k')^2} = 16 \times \left(\frac{t'^2 R}{w} \right)^2$$

3.5 Auflösung

Die Qualität einer Trennung wird durch die Auflösung RS charakterisiert. Diese ergibt sich aus der Differenz der Retentionszeiten (= Abstand der Peakmaxima der einzelnen Substanzen) und deren Peakbreiten.

$$RS = \frac{2 (t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}$$

Die Auftrennung ist umso besser, je größer RS wird.

Ungenügend ist sie bei $RS < 1$. Für die quantitative Analyse reicht nach Engelhardt (1975) $RS = 1$, was 4% in der Gaußschen Kurve entspricht. Bei einem Abstand von 6% zwischen zwei Peakmaxima, also $RS = 1,5$, erhält man eine vollständige Grundlinientrennung. RS Werte $> 1,5$ bringen nur noch eine unerwünschte Verlängerung der Analysenzeit.

Für obige Gleichung kann unter Verwendung der Bodenzahl n und der relativen Retention α auch geschrieben werden:

$$RS = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'2}{1 + k'2} \right) \sqrt{n}$$

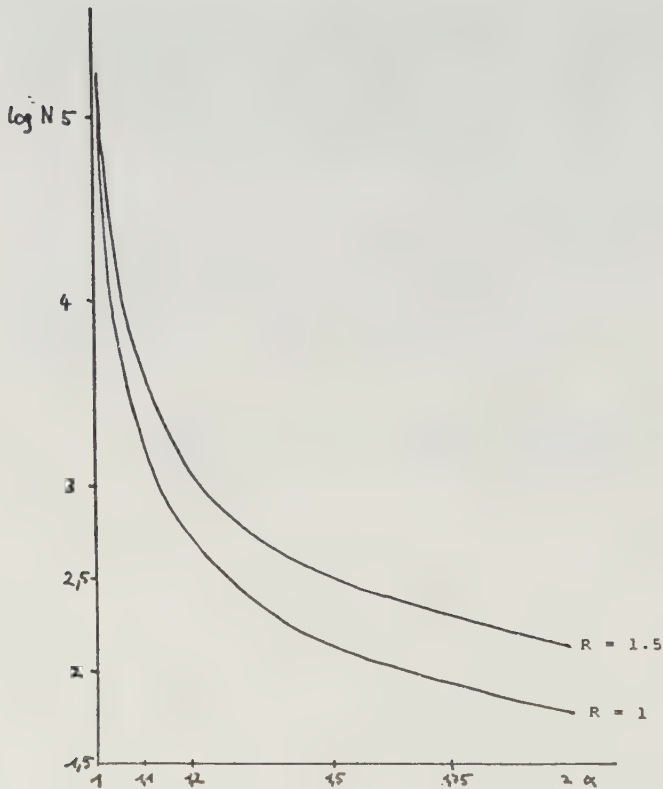
Aus der Gleichung wird auch die Bedeutung von α ersichtlich. Engelhardt (1975) bezeichnet sie mit Recht als die wichtigste Gleichung in der Chromatographie.

Formt man diese Gleichung wiederum um, so erhält man:

$$N = \left(\frac{4 R \times \alpha}{\alpha - 1} \right)^2$$

Damit lassen sich für ein gegebenes α bei festgelegtem R die für die Trennung benötigten effektiven Böden errechnen.

relative Retention	$R = 1.0$	$R = 1.25$	$R = 1.5$
1.00			
1.01	163 216	250 000	367 236
1.05	7 056	11 025	15 876
1.10	1 936	3 025	4 356
1.15	940	1 469	2 116
1.20	576	900	1 296
1.25	400	625	900
1.50	144	225	324
1.75	87	136	196
2.00	64	100	144



Graphische Darstellung der benötigten effektiven Böden (in $\log N$) bei $R = 1.5$ und $R = 1$ für verschiedene α .

Bei größerem α benötigt man weniger Böden für eine optimale Trennung. Bei höheren Ansprüchen an die Auflösung R steigt bei gleichem α die Zahl der benötigten Böden N .

Um eine Auflösung zu verbessern ist es nach Engelhardt (1975) zweckmäßiger, die Selektivität zu er-

höhen als die Zahl der effektiven Böden. Bei einer Verdoppelung der Böden (z.B. durch doppelte Säulenlänge) verbessert sich die Auflösung nur um den Faktor 1.4, während sich die Retentionszeit und damit die Analysenzeit verdoppelt.

3.6 Porosität und Permeabilität

Die Porosität ϵ ist ausschlaggebend für die Geschwindigkeit F des Eluenten.

$$\epsilon = \frac{F \times t_0}{L \times r^2 \pi}$$

Sie beträgt für Kieselgel, Aluminiumoxid, Kieselgur und Aktivkohle nach Engelhardt (1975) etwa 0.85. Die lineare Geschwindigkeit n (in cm/sec)

$$n = \frac{L}{t_0}$$

kann ebenfalls zur Errechnung von ϵ verwendet werden.

$$\epsilon = \frac{F}{v \times r^2 \pi}$$

ist dem Druckabfall Δp längs der Säule proportional.

Dieser Zusammenhang wird durch die Permeabilität K ausgedrückt (Engelhardt (1975)).

$$K = \frac{v \times \eta \times L}{\Delta p}$$

η = die Viskosität des Eluenten

4. Optimierende Methoden für die RP-HPLC

Als Darstellung der Möglichkeiten der Optimierung bietet sich das sogn. "magische Dreieck" der Chromatographie an.



Wobei Kap (Kapazität) für die Belastbarkeit des Systems steht. (nach Engelhardt(1975))

Eine Optimierung kann nur längs einer Geraden erfolgen, was immer nur auf Kosten des dritten Parameters geschieht.

4.1 Die Bedeutung der Analysenzeit

Die Trennzeit ist direkt abhängig von der Auflösung und damit auch Bodenhöhe und relativer Retention; außerdem noch von der Säulenlänge, der Teilchengröße des Füllmaterials der Säule, der Porosität und damit von der Dichte der Packung und vom Druckabfall entlang der Trennsäule, welcher durch die Permeabilität ausgedrückt wird.

Weitere Faktoren sind die Viskosität des Fließmittels und dessen Geschwindigkeit, die durch den Eingangsdruck gesteuert werden kann.

Daraus wird ersichtlich, daß sich zur Optimierung der Analysenzeit die Veränderung verschiedener Parameter anbietet.

Die Auflösung sollte nicht größer als 1.5 sein, weil dies sonst zu einer unnötigen Verlängerung der

Trennzeit führt. Die Säulen sollten möglichst kurz sein, ohne jedoch die benötigte Bodenzahl zu unterschreiten. Dies könnte zwar durch Verwendung kleinerer Teilchen in begrenztem Rahmen ausgeglichen werden, dabei muß allerdings nach Engelhardt (1975) berücksichtigt werden, daß die Bodenzahl dem Quadrat des Teilchendurchmessers umgekehrt proportional ist und sich bei Verwendung kleinerer Teilchen auch die Permeabilität der Säule verändert. Dies erfordert wieder höhere Drücke. Außerdem spielt das apparative Totvolumen bei kürzeren Säulen eine größere Rolle.

Die effektiven Böden pro Sekunde gelten als Maß für die Analysengeschwindigkeit.

$$\frac{N}{t} = \frac{u}{h} \frac{k'^2}{(1 + k')^3}$$

Je größer die Zahl der effektiven Böden pro Sekunde ist, desto kürzer ist die Analysenzeit. (Engelhardt 1975)

Das optimale Massenverteilungsverhältnis k' liegt zwischen 1.5 und 4.

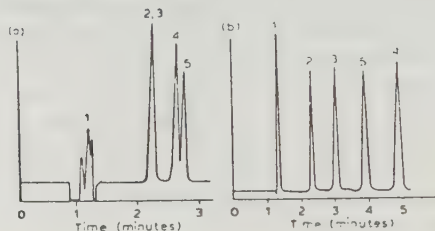
Die optimale Geschwindigkeit für eine Trennung ist dort gegeben, wo die h/u Werte sich niedrigeren Werten nähern, ohne jedoch mit einer wesentlichen Steigerung der Geschwindigkeit – was zu erhöhten Drücken führt – verbunden zu sein. Zu langsame Geschwindigkeit führt zu unnötig breiten Peaks.

4.2 Die mobile Phase

Außer Wasser, dem am meisten verwendeten Eluenten in der Reversed-phase HPLC, kommen noch Methanol, Acetonitril, Tetrahydrofuran und Chloroform zur Anwendung.

Wasser ist in der RP-HPLC das schwächste Lösungs-

mittel. Es hat die größte Porarität und Oberflächenspannung und beeinflusst am nachhaltigsten die Retentionszeit. Meistens verwendet man in der RP-HPLC ein Gemisch aus zwei Komponenten. (siehe hierzu auch Tab. III S.33)



(aus Parris (1984))

a = Thf/Wasser (52:48)

b = Methanol/Wasser (63:37)

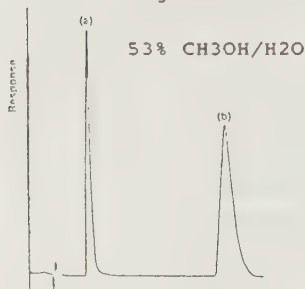
Es wurde eine RP-C8 Säule verwendet. Temperatur 35°C.

Flow 2 ml/min. 1 = Lösungsmittelfront, 2 = Phenol,

3 = Benzaldehyd, 4 = Methylbenzoat, 5 = Nitrobenzol

Methanol besitzt durch seine höhere Polarität gegenüber Thf in der RP Chromatographie, wie an diesem Beispiel gezeigt wird, den Vorteil der größeren Retention. Dies führt zu einer besseren Trennung der Peaks.

Aber auch bei gleicher Polarität verschiedener Lösungsmittelgemische kann eine Trennung optimiert werden.



62% CH3CN/H2O



RP-C18 Säule. a = Dimethylphtalat, b = Diethylphtalat
Flow 1.2 ml/min (nach Issaq (1984))

Durch Veränderung des 2-Komponentengemisches kann es auch zu einer Vertauschung der Peakreihenfolge kommen. Dies kann bei bestimmten Trennproblemen von Vorteil sein.

Mobile Phase	Reihenfolge der Elution
72% Methanol/H ₂ O	N - A - B - M - E
62% Acetonitril/H ₂ O	A - N - M - B - E
42% Thf / H ₂ O	A - M - N - E - B

A = Antraquinon, B = Biphenyl, E = Ethylantraquinon,
M = Methylantraquinon, N = Naphtalen
(Issaq (1984))

Den Einfluß von Wasser auf die Trennung von Benzpyren und Antracen, ausgedrückt durch die relative Retention α , bei Verwendung von Alkoholen verschiedener Kettenlängen, zeigt folgende Tabelle nach Issaq (1984).

Alkohol	%	
Methanol	95	1.74
Äthanol	100	1.16
	85	1.52
	78	1.65
n-Propanol	95	1.17
	83	1.34
	74	1.46

Um im voraus die Lösungsmittelstärke von in der RP-HPLC verwendeten 2-Komponentengemischen abschätzen zu können, bedient man sich folgender Gleichung:

$$ST = \sum_i S_i \Psi_i$$

ST = Lösungsmittelstärke des 2-Komponentengemisches

Ψ_i = Anteil des Lösungsmittels in % : 100

S_i = Faktor der Lösungsmittelstärke des Eluenten
(Rechenbeispiel nach Parris (1984))

$$\begin{aligned} ST &= S_{\text{Methanol}} \times \Psi_{\text{Methanol}} + S_{\text{Wasser}} \times \Psi_{\text{Wasser}} \\ &= 2,6 \times 0,6 + 0 \times 0,4 \\ &= \underline{1,56} \end{aligned}$$

Dann gilt für Acetonitril bei einer Lösungsmittel-
stärke von 3.2 $ST_{\text{Methanol/Wasser}}$ 1.56

$$ST_{\text{Acetonitril}} = \frac{1.56}{3.2} = \frac{1.56}{3.2} = \underline{0.49}$$

Entsprechend für Thf

$$ST_{\text{Thf}} = \frac{1.56}{4.5} = \underline{0.35}$$

Die selbe Lösungsmittelstärke haben also:

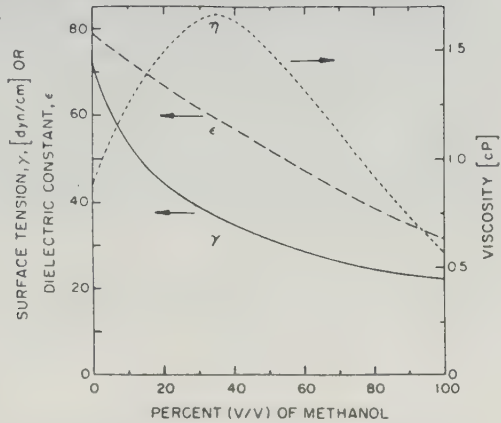
Methanol	:Wasser	60:40
Acetonitril	:Wasser	49:51
Thf	:Wasser	35:65

Die Retention und damit die Analysenzeit wird erhöht durch abnehmende Dielektrizitätskonstante (siehe Tab.IIIS.33) und zunehmende Oberflächenspannung. Sie beträgt für Methanol und Äthanol 22 dyn/cm, Thf 27.6 dyn/cm, Acetonitril 29 dyn/cm und Wasser 73 dyn/cm.

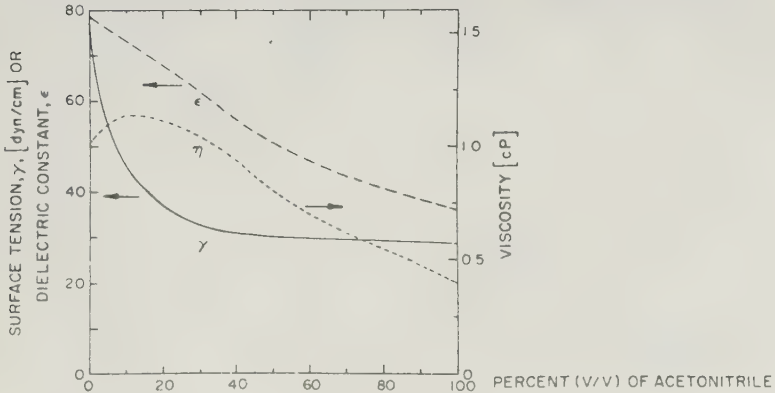
Das Diffusionsvermögen des Eluats hängt von der Viskosität der mobilen Phase ab. Dies beeinflusst auch den Wirkungsgrad der Säule.

Den Zusammenhang von Viskosität, Oberflächenspannung und Dielektrizitätskonstante, abhängig vom

Methanol:Wasser-Verhältnis, zeigt folgende Graphik nach Heftman (1980).



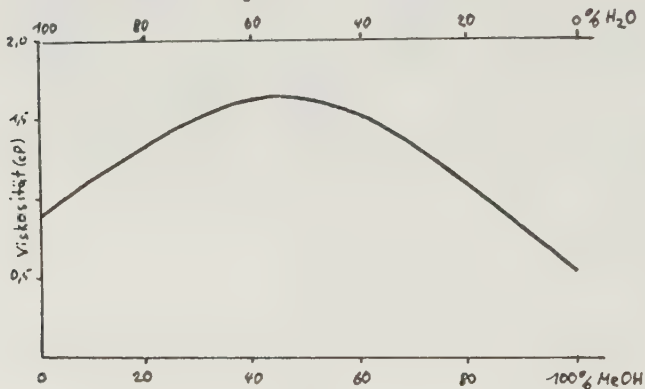
Im Vergleich dazu Acetonitril/Wasser (Heftman (1980)).



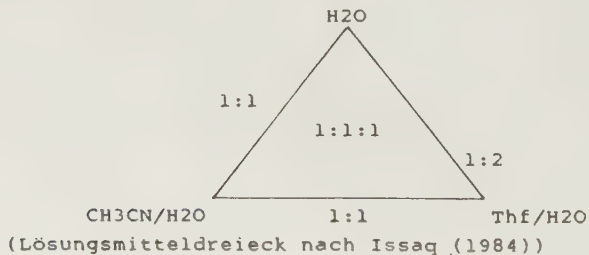
Es wird deutlich, daß mit steigendem Anteil an organischem Lösungsmittel Oberflächenspannung und Dielektrizitätskonstante kontinuierlich abfallen, während die Viskosität zuerst ansteigt und erst später absinkt.

Wang et al. (1983) haben herausgefunden, daß, wenn als Hauptfaktoren der Peakverbreiterung Massentransfer- und Diffusionseffekte innerhalb der RP-Säule überwiegen, der Wirkungsgrad der Säule mit der Zunahme der Viskosität des Methanol/Wasser-Gemisches abnimmt. Andererseits kann eine Zunahme der Viskosität der mobilen Phase den Wirkungsgrad der RP-Säule verbessern, wenn Effekte außerhalb der Säule die Hauptrolle spielen.

Abhängigkeit der Viskosität vom % Anteil MeOH:H₂O bei 25°C (nach Wang et al. 1983).



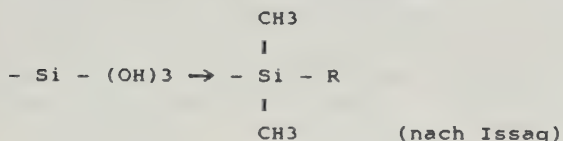
Um die bestmögliche Kombination von Lösungsmittelkomponenten ausfindig zu machen, gibt es verschiedene Rechenmodelle nach Belinky (1980), Glaych (1980) und Issaq (1984).



Es stehen verschiedene Computerprogramme zur Ermittlung der geeignetsten Lösungsmittelkombination zur Verfügung (Issaq (1984)).

4.3 Die stationäre Phase

Bei der RP-Säule wird ein organischer Teil an eine Silanolgruppe durch folgende Reaktion gebunden:



R ist eine aliphatische Kette in der Länge von C2 bis C22, eine Phenolgruppe, eine aliphatische Kette mit -NH₂, -CN oder eine andere funktionelle Gruppe. Die Addition dieser Gruppen verbessert die Selektivität der stationären Phase.

Die mit Alkylgruppen bedeckte Oberfläche der stationären Phase gleicht einem Flüssigkeitsfilm oder einer "Bürste", wobei die Gruppen einzeln oder zu Bündeln verflochten oder gekrümmt auf der Oberfläche liegen. Diese wird nun von der Länge der Alkylketten und der Zusammensetzung der mobilen Phase determiniert (Colin et al. (1983)).

Verschiedene Phänomene, die in der stationären Phase erscheinen, beeinflussen die Selektivität und erhöhen die Retention.

- Dazu gehören freie Silanolgruppen, die aus sterischen Gründen nicht alle auf der Kieselgeloberfläche mit OH reagieren konnten.
- Beim Bindungsprozeß kann die höchstmögliche Oberflächenspannung nicht erreicht werden.
- Wegen des sauren Charakters der Kieselgeloberfläche sind die freien Silanolgruppen vor allem

für die polaren Lösungsmittel von Bedeutung.

- Besteht die mobile Phase nicht aus einer reinen Flüssigkeit (Verunreinigungen), so werden ein oder mehrere Bestandteile vom Träger vorzugsweise extrahiert. Dieser ist dann von einer Schicht absorbieren-der Flüssigkeit bedeckt, deren Zusammensetzung sich von der der mobilen Phase unterscheidet. Es kommt zu einer gegenseitigen Beeinflussung von Lösungsmittelbestandteilen und Trägermaterialien.

In Abhängigkeit von der Struktur der stationären Phase, kann die Lösungsmittel-Ligand-Verbindung von einer Abnahme der Entropie begleitet sein. Dieser Effekt kann nur mit Lösungsmittelmolekülen stattfinden, die gegenüber Rotationen, die sich in Veränderungen der Konformation niederschlagen, empfindlich sind. Im Gegensatz zu den anderen Effekten vermindert dieser die Retention.

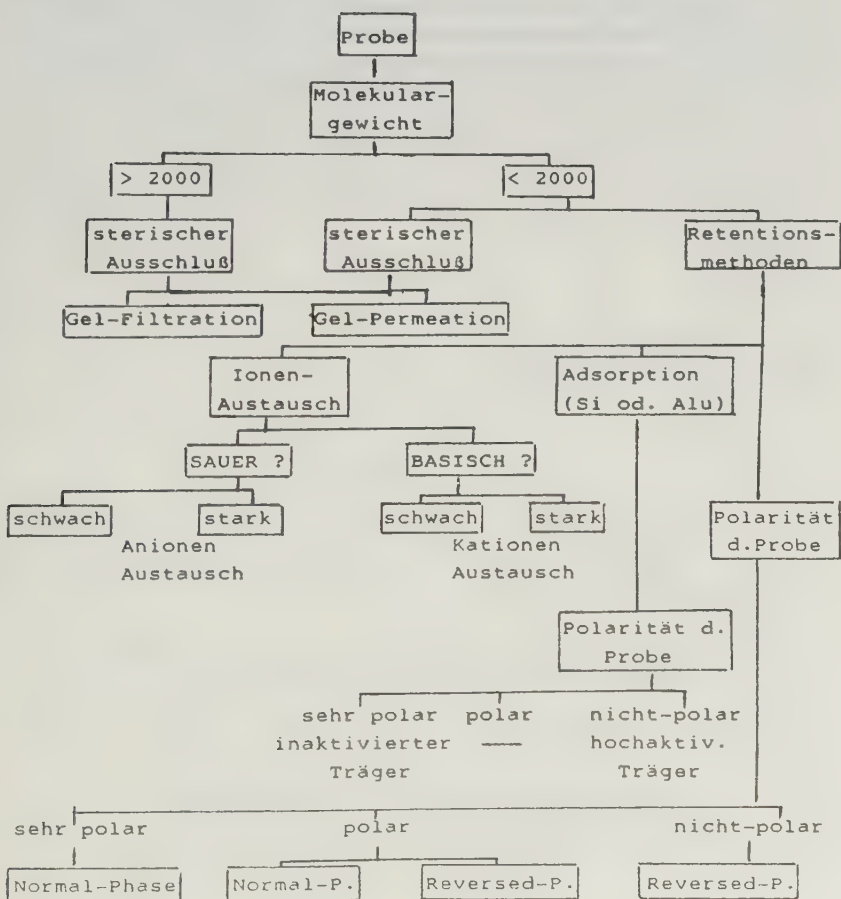
Colin (1983) wies darauf hin, daß die Entropie von n-C18 gebundenem Kieselgel sich von der des freien n-C18 - Moleküls unterscheidet. Dies kann eine Auswirkung auf den k' -Faktor haben.

Zur Trennung aller Moleküle mit einem Molgewicht < 2000 Daltons, kann die kohlenwasserstoffgebundene RP-Säule verwendet werden. Bei Eluaten niedriger Polarität (Glycerin, Steroide, Terpene, Kohlenwasserstoffe etc.), die in Wasser unlöslich und in Methanol oder einem anderen mit Wasser mischbaren organischen Eluenten löslich sind, wird diese Säule bevorzugt.

Colin entwickelte anhand der Verteilungschromatographie Möglichkeiten zur Bestimmung der geeigneten Belegung der stationären Phase für RP-Säulen. Er wies allerdings darauf hin, daß sich vor allem wegen oben genannter Interaktionen und deren Einfluß auf die Selektivität, zuverlässige Vorhersagen über das richtige Trägermaterial nur für Lösungsmittel machen läßt, die der gleichen Stoffgruppe angehören. Bei ihnen sind die Sekundäreffekte, die eine Vorhersage sonst unmöglich machen würden, annähernd gleich.

Durch Belegung der Säulen mit verschiedenen langen Kohlenwasserstoffketten kann das Retentionsverhalten entscheidend verändert werden. Diesen Umstand überprüften Shaikh und Tomaszewskii (1983) mit einer Untersuchung an 8 verschiedenen käuflichen RP-Säulen.

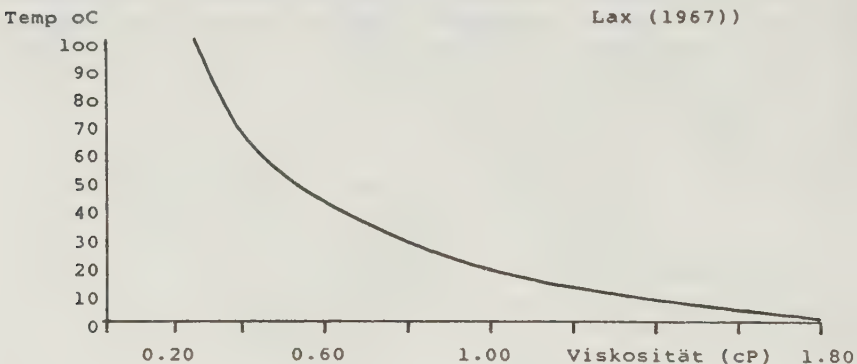
Einen Anhaltspunkt für die Auswahl einer geeigneten Säule gibt folgendes Diagramm nach Parris (1984).



4.4 Der Einfluß der Temperatur

Den Zusammenhang zwischen Erhöhung der Temperatur und Abnahme der Bodenhöhe und ihre Bedeutung für die Effizienz der Trennung, haben Beiträge von Schmit et al. (1971) aufgezeigt.

Durch erhöhte Arbeitstemperatur kann der Massentransfer der mobilen und der stationären Phase, sowie die Löslichkeit der Probenbestandteile verbessert werden. Sie reduziert auch den notwendigen Säulendruck bei gleichem Flow. Wasser als wichtige Lösungsmittel-Komponente hat eine vergleichsweise hohe Viskosität. Durch höhere Temperaturen kann sie - wie folgende Graphik zeigt - vermindert werden. Der Einfluß des Druckes ist vor allem im relevanten Bereich zu vernachlässigen. (Graphik n. D'Ans' Lax (1967))



4.5 Die Gradientensteuerung

Bei bestimmten Trennproblemen kann es nützlich sein, im Lauf der Analyse den Wasseranteil zu variieren.

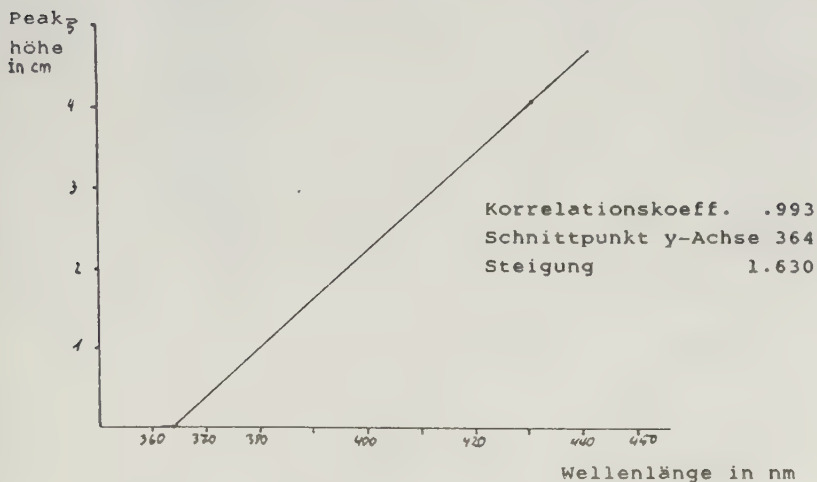
Z.B.:

Zuerst mit Methanol/Wasser (40:60) fahren - damit erreicht man eine gute Peaktrennung - und nach der Chromatographie des letzten interessierenden Peaks kontinuierliche Erhöhung des Methanolanteils (z.B. auf 95%). Die Trennung wird dadurch beschleunigt, die Säule von

eventuellen Rückständen gereinigt und die Zeitdauer der Neukonditionierung - bis die nächste Analyse gestartet werden kann - verkürzt.FN

4.6 Die Wahl der geeigneten Wellenlänge

Die geeignete Wellenlänge des Detektors ist für die Darstellung der Peakhöhe von entscheidender Bedeutung. Die Graphik zeigt die Abhängigkeit der Peakhöhe von der Wellenlänge des Detektors.

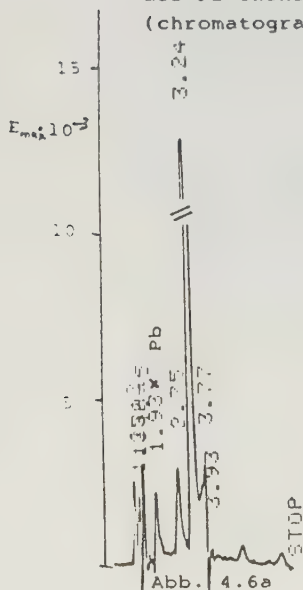


500ng Pb/10 μ l Injektion. Säule: MN Nucleosil 5 C18 S 20cm
Fließmittel: Methanol/Wasser/Chloroform (55:25:20) +
1ml 1% Oxinlösung/1 Liter gepuffert mit NH₃.

FN

Als Faustregel kann gelten, daß sich mit Erhöhung des Prozentanteils an Wasser um 10%, bei der RP-HPLC die Retentionszeiten um etwa den Faktor 2 erhöhen.

Abb. 4.6 Abhängigkeit der detektierten Peakhöhe des Pb-Oxins von der verwendeten Wellenlänge (chromatographische Bedingungen s.S. 55)



WL: 380nm
ATTN 2†4

tR Pb-Oxin = 1.92

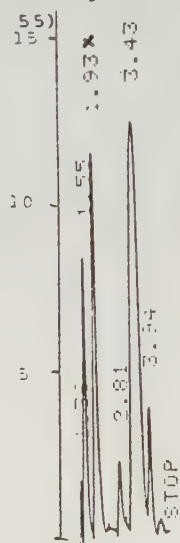


Abb. 4.6b

WL: 445
ATTN 2†4

Parallel dazu verringert sich die Höhe der Störpeaks mit zunehmender Wellenlänge (s.S. 57 Abb. 4.6c und 4.6d).

4.7 Die On-column-Chelatbildung

Eine weitere Möglichkeit der Optimierung geht auf Berthod et al. (1979) zurück. Sie injizierten nicht fertige Chelatkomplexe, sondern belegten eine RP-Säule mit 8-Hydroxychinolin. Mit dem Lösungsmittelgemisch Methanol/Wasser (55:45) als mobile Phase, das ebenfalls geringe Mengen Oxin enthielt, gelang ihnen die Trennung einer Lösung von Cu(II), Co(II), Ni(II) und Hg(II).FN 1

Abb. 4.6c,d Verkleinerung der Störpeaks des Oxins mit zunehmender Wellenlänge.

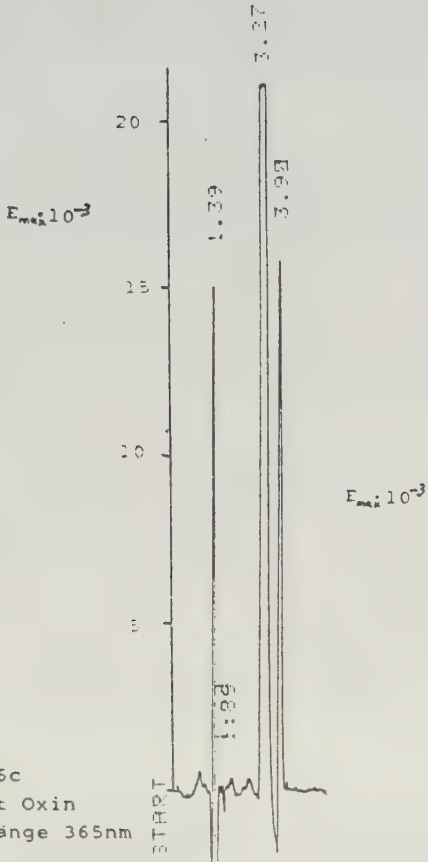


Abb. 4.6c
Leerwert Oxin
Wellenlänge 365nm

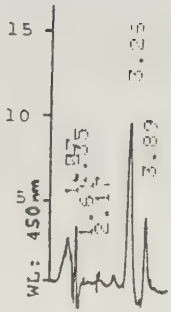


Abb. 4.6d
Leerwert Oxin
Wellenlänge 450nm

FN 1

Hoffman und Schwedt verwendeten diese Methode mit Erfolg zur Trennung von Mn(II) und Mn(III). Dabei umgingen sie das von ihnen beobachtete Phänomen der Änderung der Oxi-
dationsstufe -durch die Anwesenheit von Luft- während
der Chelatisierung.

4.8 Vorhergehende Anreicherung mit Einmal-Trennsäulen

Die Idee der vorhergehenden Anreicherung geht auf Arbeiten von Watanabe et al. zurück (1981). Rössner und Schwedt (1983) übernahmen sie und konnten eine Verbesserung ihrer Ergebnisse erzielen.

4.9 Vorkonditionierung mit Komplexbildnern

Nach Hutchins et al. (1982) läßt sich durch Vorkonditionierung der Säule mit EDTA (0,005 Mol) die Chromatographie von Metallchelaten mit Diethyldithiocarbamaten verbessern. Co(III), Cr(III), Cu(II), Hg(II), Ni(II), Pb(II), Se(IV) und Te(IV) konnten mit dieser Methode gut dargestellt werden. Das Fehlen eines Zn(II) Peaks führten sie auf Reaktionen zwischen Zn und den Edelstahlkomponenten (hauptsächlich Fe, Cr, Ni und Mo) der Säule zurück.FN 2

Hier zeigt sich auch die Problematik dieser Vorkonditionierung. Zwar läßt sich durch die Verwendung einer Glas-Säule einem Teil des Problems der Zersetzung aus dem Weg gehen, es muß aber angemerkt werden, daß die übrigen Teile des Chromatographen zum größten Teil aus Edelstahl bestehen.

FN 2

Schon Amin und Jakobs (1974) erreichten durch Vorbehandlung von Kieselgelplatten mit EDTA und anderen Komplexbildnern eine erhebliche Verbesserung der Chromatographie.

5. Geräte zur HPLC

Für die Durchführung der chromatographischen Versuche wurde ein Hochdruckflüssigkeits-Chromatograph der Firma Hewlett-Packard HP 1084B mit Einspritzautomatik, verstellbarem Hub (in der Regel wurden 10µl injiziert), variablen Wellenlängendetektor (190nm-600nm) und Fraktionssammler verwendet.

Die Mischung der 2 Lösungsmittelbehälter A und B erfolgt über zwei Kolbenmembranpumpen.

Drucker/Plotter: HP 79850 A LC Terminal

Säule: Nucleosil 5 C18, 125 x 8 x 4mm Macherey&Nagel
Düren

5.1 Programmierung

Es lassen sich unter anderem folgende Parameter eingeben:

FLOW von 0,1 bis 10 ml/min (der beste Arbeitsbereich mit den geringsten Abweichungen liegt zwischen 1 - 2ml)

%B variabel zwischen 0 und 100% (analog dazu verhält sich dann der %Anteil A)

OVEN TEMP von 50°C - 100°C

WAVL S:R 190nm - 600nm

CHT SPD Papiergeschwindigkeit 0-15 cm/min in 0.01 Schritten

ATTN 2↑n Empfindlichkeit des Schreiberausschlags pro Detektorsignal in Potenzschritten von 0 - 15 (2↑3 hohe Sensitivität, 2↑9 niedere Sensitivität etc.)

(Weitere Funktionen siehe HP Manual 1978).

5.1.1 Timeprogram

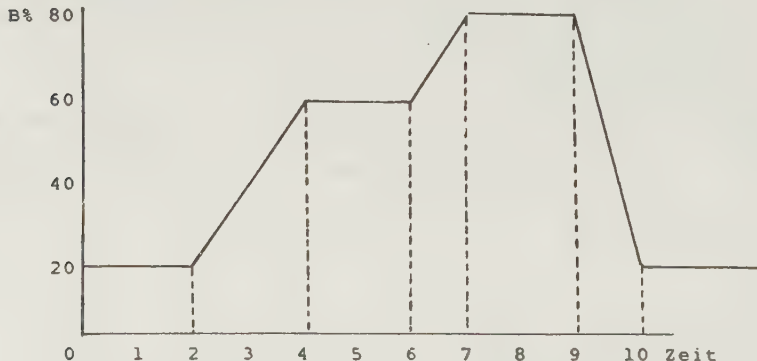
Das HPLC-Gerät ist auch für einen vollautomatischen Betrieb, bei dem bis zu 60 verschiedene Proben hintereinander untersucht werden können, programmierbar.

5.2 Fraktionssammler

Die PREP-Taste dient dazu, Peaks nach dem Durchlauf durch den Detektor in getrennten Behältern aufzufangen. Die so fraktionierten Peaks können dann weiteren Analysen – z.B. mit der AAS als Referenzmethode – unterzogen werden.

5.3 Gradientensteuerung

Mit der Gradientensteuerung lassen sich Fließgeschwindigkeit und prozentualer Anteil der Lösungsmittel in Behälter A und B so steuern, daß die notwendige Analysenzeit und eine neue Konditionierung verkürzt und interessierende Elutionspeaks besser herausgearbeitet werden können. Dies erfolgt durch Angabe der gewünschten Zeit mit dem dazugehörigen %B Anteil und dem Zeitpunkt, bis zu dem der eingegebene Anteil an %B erreicht werden soll.



Die technischen Details der HPLC-Apparaturen werden in der von Huber herausgegebenen Aufsatzsammlung (1978) "Instrumentation for High-Performance Liquid Chromatography" eingehend behandelt.

6. Verwendete Reagentien

Metanol LiChrosolv von Merck Darmstadt

Chloroform p.a. von Merck "

Wasser, bidest. von Braun Melsungen

Standardlösungen: Co, CU, Cd, Pb, Zn, As, Tl von Merck
Chelatbildner

8-Hydroxychinolin p.a. von Merck

8-Mercaptochinolin-Hydrochlorid purum von Fluka Buchs (CH)

2-Methyl-8-Mercaptochinolin (Synthese siehe Anhang II)

7. Extraktion

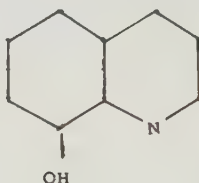
2ml Wasser oder Pufferlösung werden in einem Reagenzglas mit 2ml Chloroform, 20µl 100mg% Schwermetalllösung und 500µl 1% Chelatbildner 1 min mechanisch geschüttelt. Die organische Phase wird abgetrennt.

10µl Injektionsmenge entsprechen dann 100ng Metall.

8. Das 8-Hydroxychinolin

Das 8-Hydroxychinolin (Oxin) zählt seit der Veröffentlichung von Berg (1935) zu den bekanntesten analytischen Fällungsreagentien. Eine zusammenfassende Darstellung der Verwendung des Oxins gibt Hollingshead (1954/1956).

Oxin ist ein 5-Ring-Chelatbildner und reagiert mit allen Elementen der A-, B- und Ü-Gruppe, die schwerlösliche Hydroxide oder lösliche Hydroxido- und Amminkomplexe bilden.



8.1 Komplexbildungs- und Extraktionsverhalten

8.1.1

Das 8-Hydroxychinolin bildet farbige Komplexe mit allen toxisch relevanten Schwermetallen (mit Ausnahme von As), die mit Chloroform extrahierbar sind.

Bis auf Ni und As lassen sich nach Umland (1962) alle photometrisch gut bis sehr gut bestimmen. Die Lichtabsorptionsmaxima ϵ_{max} liegen zwischen 370nm für Zn und 580nm für Fe(III). Die Extinktionskoeffizienten der Metalloxi-nate in Chloroformlösung liegen zwischen 4200 für Cd und 8500 für Mn(II). Das Extinktionsmaximum von Oxin in Chloroform liegt bei 315nm (Koch, Koch-Dedic (1974)).

Über die Abhängigkeit des Extraktionsverhaltens vom pH-Wert gibt es unterschiedliche Angaben, die teilweise über einen großen pH-Bereich streuen. Generell lässt sich fest-

stellen, daß sich der Verteilungsbereich zwischen Wasser und Chloroform, bei dem die Stabilität der Metallchelate am größten ist, um pH 7 bewegt.- Eine Ausnahme bildet hier nur Tl, das im Alkalischen extrahiert werden sollte.-

8.2 Die Verwendung des Oxins zur Chromatographie von Metallchelaten

Über den Gebrauch des Oxins als Komplexbildner in der HPLC gibt es nur wenige Arbeiten. So sind hier vor allem Berthod (1979), Wenklawiak (1981/1982) (siehe Kap. 3.1.2.3) und Hambali und Haddad (1980) zu nennen. Letztere verwendeten eine Si 60-Säule und ein Fließmittelgemisch aus Methanol/Chloroform (5:95). Sie detektierten bei einer Wellenlänge von 254nm 0.9 ng Al(III) und 17 ng Co(III). Watanabe et al. (1981) wiesen Cu und Mg nach.

Auf RP 8- bzw. RP 18-Säulen, mit einem Methanol/Wassereluenten (60:40) konnten Hoffman und Schwedt (1982) mehrere Metallchelate - Cr, Co, Cu, Al, Zn, Mn - nachweisen (siehe Kap. 3.1.2.2).

8.3 Chromatographie der Cu-, Co- und Pb-Oxinate auf RP-Phasen

Das Cu-Oxin läßt sich gut chromatographieren. Sein t_R -Wert liegt bei 4.51min für ein Methanol/Wassergemisch von 75:25 (Flow 1ml/min) s. Abb. 8a.

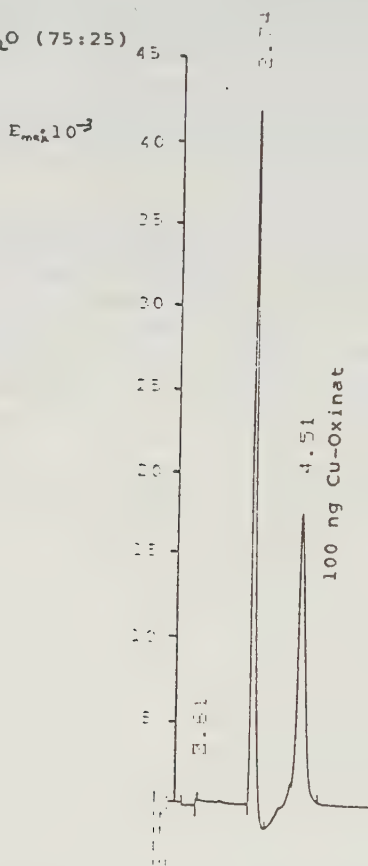
Da die Absorptionsspektren des in Chloroform gelösten Oxins und des in $CHCl_3$ extrahierten Cu-Oxinchelates annähernd identisch sind, wurde durch Veränderung des pH-Wertes und Zugabe von Chloroform in das Fließmittel versucht, den Störpeak des injizierten Chloroforms zu minimieren.

Abb. 8a 100ng Cu-Oxinat

Flow 1ml/min; Detektionszeit 4.51min; Wellenlänge 410nm

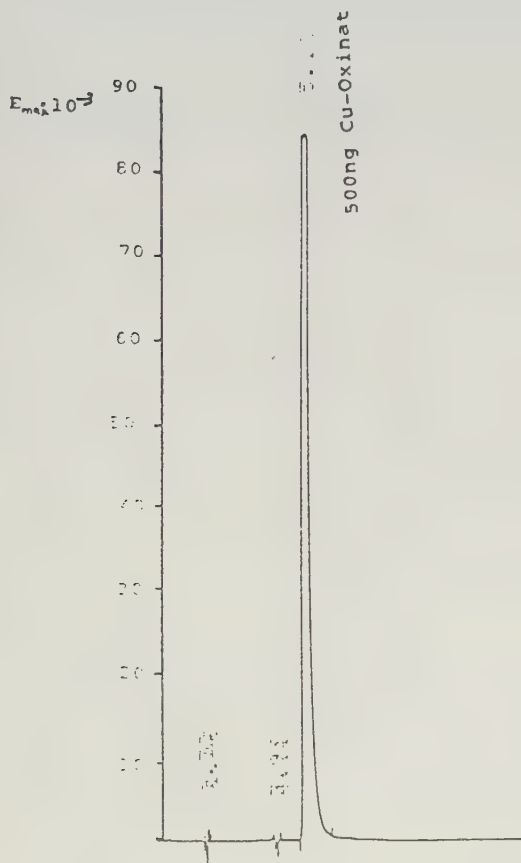
Stationäre Phase: Nucleosil RP 5 C18 (Macherey & Nagel)
125x8x4mm

Mobile Phase: MeOH:H₂O (75:25)



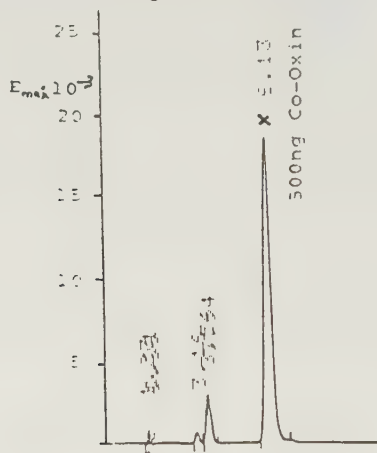
Das beste Ergebnis konnte mit einem Gemisch aus Methanol/Wasser/Chloroform (55:25:20), dem 1ml 1% Oxinlösung zugesetzt wurde, erzielt werden. Damit erreichte man ein völliges Verschwinden des störenden Oxinpeaks (s. Abb. 8b). Der Einfluß des pH-Wertes auf die Chromatographie war nur gering.

Abb. 8b 500ng Cu-Oxinat Flow 1ml/min;
 Wellenlänge 410nm; Detektionszeit 5.10min;
 Stationäre Phase: siehe Abb. 8a
 Mobile Phase: MeOH/H₂O/CHCl₃ (55:25:20) + 1ml
 1% Oxinlösung



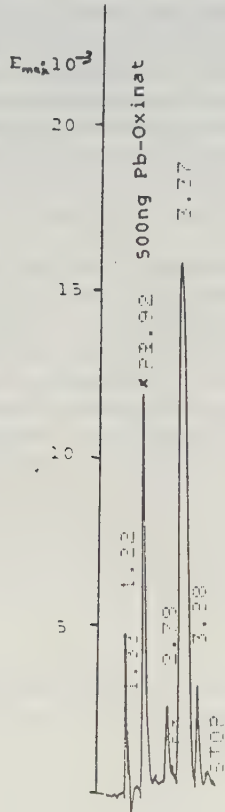
Ein befriedigender Co-Oxinat Peak läßt sich bei einer Wellenlänge von 400nm detektieren. Es wurde unter den selben Bedingungen wie bei Abb. 8a chromatographiert. Nur wurde hier eine 0.2% Oxinlösung zur Chelatbildung verwendet. Damit läßt sich zwar der Störpeak verringern, gleichzeitig verkleinert sich aber auch der Metallchelate-Peak (s. Abb. 8c).

Abb. 8c 500ng Co-Oxin Parameter siehe Abb. 8a;
zur Chelatbildung wurde allerdings eine 0.2% Oxinlösung
verwendet; Wellenlänge 400nm; Detektionszeit 6.13min



Das Pb-Oxin eignet sich ebenfalls zur Chromatographie. Hier machte sich der Einfluß der Wellenlänge besonders gravierend bemerkbar (siehe hierzu auch Kap. 4.6). Die besten Ergebnisse konnten bei einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol/Wasser/Chloroform (55:25:20) + 1ml 1% Oxinlösung (auf 1l) + NH_3 -Puffer erreicht werden (s. Abb. 8d S.67).

Abb. 8d 500ng Pb-Oxinat weitere Parameter siehe Abb. 8b
der Chelatkomplex wurde mit NH -Puffer eingestellt;
Wellenlänge 450nm; Detektionszeit 1.92min



8.4 Diskussion

Die Zugabe von Chloroform zu dem Wasser/Methanoleluenten verbessert die Chromatographie der untersuchten Metallchelate. Mit dem Zusatz von 1% Oxinlösung in das Fließmittel läßt sich eine weitere Verbesserung erreichen.

- Auf die dabei entstehende Problematik wurde bereits an anderer Stelle eingegangen (Kap. 4.9).-

Die Wellenlängen für eine optimale RP-Chromatographie liegen für Cu-Oxinat bei 410nm, für Co-Oxinat bei 400nm und für Pb-Oxinat bei 450nm.

Die theoretische Nachweisgrenze ist nicht erreichbar. Von größerer praktischer Bedeutung scheint die Erfassungsgrenze zu sein. Sie liegt bei 10ng-20ng.

Da die t_R Werte der einzelnen Chelate von einander differieren - t_R Cu-Oxin 5.10min, t_R Pb-Oxin 1.92min und t_R Co-Oxin 6.13min (bei MeOH/H₂O 75:25; t_R Cu-Oxin mit diesem Fließmittel 4.51min) - lassen sie sich auch in einem Gemisch trennen. As, Cd, Tl und Hg lassen sich nicht chromatographieren.

9. Das 8-Mercaptochinolin

Wird beim Oxin das O als Ligandatom durch S ersetzt, erhält man das 8-Mercaptochinolin (Thiooxin). Nach Umland (1971) ist die Selektivität größer als beim Oxin, da es aufgrund des S-Liganden nur mit B- und Ü-Kationen und den schwefelaffinen Elementen Mo, W und V der A-Gruppe reagiert. Durch Bankowskii (1978) wurde das Thiooxin in die Analytik eingeführt.

9.1 Komplexbildungs- und Extraktionsverhalten

Die Thiooxinate sind in Wasser schwer löslich. Der pH-Bereich maximaler Extraktion liegt wegen des kleineren pK-Wertes des Thiooxins bei niedrigeren pH-Werten als beim Oxin. Eine Ausnahme machen hier nur Ni und Zn. Ag, Au und Cd sind nicht mit Chloroform extrahierbar.

Die Thiooxinate ergeben in vielen Fällen intensiver gefärbte Komplexe als die Oxinate.

Am stärksten sind die Thiooxinate von Mn, Fe, Cu und Co (braun), weniger das von Ni (himbeerrot) und schwach jene von Zn, Hg, As und Tl (gelb) gefärbt (Bankowskii (1978)).

9.2 Die Verwendung des 8-Mercaptochinolins zur Chromatographie von Metallen

König et al. (1979) konnten unter Verwendung von Kieselgel 60, Aluminiumoxyd 60, silanisiertem oder mit EDTA konditioniertem Kieselgel 60 insgesamt 17 Elemente chromatographieren. Sie benutzten eine Wellenlänge von 254nm und verschiedene Fließmittel. Mit Kieselgel 60 F (Detektion: Fluoreszenzlöschung bei 254nm) konnten die toxisch relevanten Metalle Fe, Zn und Hg bis zu einer

Nachweisgrenze von 5ng, Co, Ni, Cu und Pb bis zu einer Grenze von 10ng chromatographiert werden. Die Co-Chromatographie ergab zwei Flecke. Als problematisch erwies sich allerdings die Trennung von Zn und Pb. Das Tailing von Zn und Pb auf Kieselgel 60, das von Cu, Zn und Pb auf silanisiertem Kieselgel 60 und das von Ni, Os, Cu, Zn und Hg auf Aluminiumoxid 60 konnte durch Vorbehandlung der Platte mit EDTA verhindert werden.

Durch pH-abhängige Fällung und Extraktion kann nach König et al. (1979) eine Vortrennung erreicht werden. Die nichtextrahierbaren Komplexe von Ag, Au und Cd konnten nach dem abfiltern auf Aluminium 60 mit Toluol/Eisessig (90:10) chromatographiert werden.

Schneeweis benutzte die HPLC-Adsorptionschromatographie zum Nachweis von Fe-, Co- und Ni-Thiooxinat. Letzteres ergab allerdings zwei Peaks (1982). Die besten Ergebnisse lieferte eine Si-100-Säule mit Chloroform und Tetrahydrofuran (99:1) als mobile Phase bei einer Wellenlänge von 270nm. Mit dem gleichen Fließmittel, jedoch einer Si-60-Säule und einer Wellenlänge von 261nm bestimmte er Hg (bei Hg > 2µg, WL: 370nm). Nach seinen Angaben liegt die Nachweisgrenze für Hg-Thiooxinat zwischen 5ng und 15ng.

Siehe hierzu Graphik aus Schneeweis (1982).

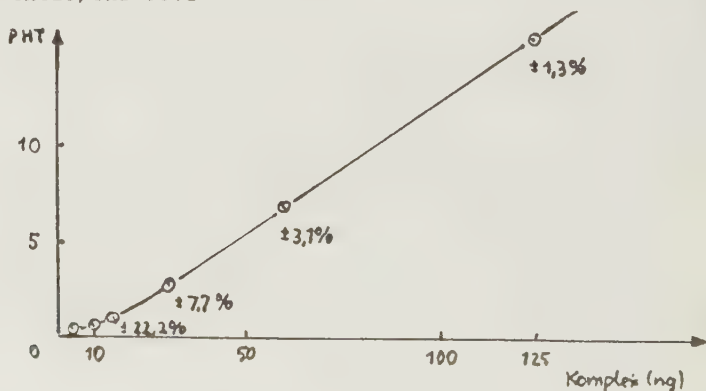
Fertigsäule Si-60 (Knauer)

Mobile Phase: CHCl₃/Thf 99:1

Flow: 2ml/min

Temp. 25 °C

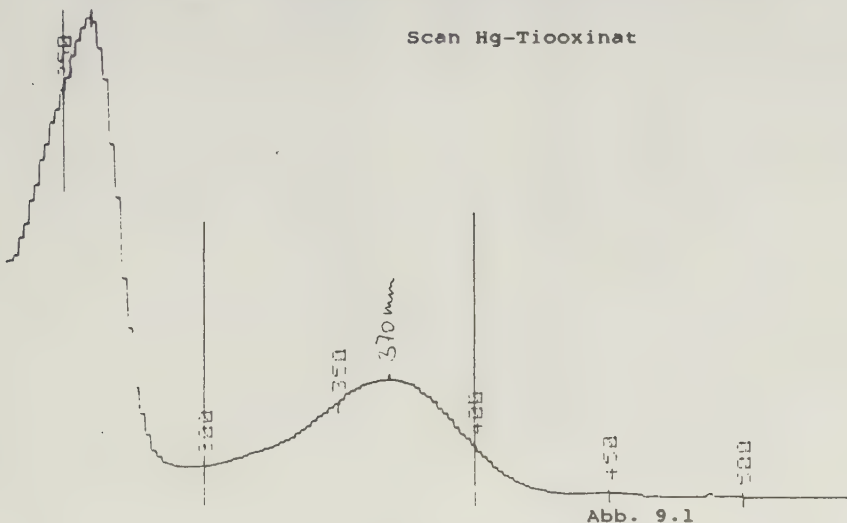
WL: 261nm



Nach Schneeweis (1982) lassen sich mit der RP-HPLC Cr-, Fe-, Co-, Ni-, Rh-, Pd-, Ir-, Pt-, Zn- und Hg-Thiooxinat unzersetzt und nur mit geringem Tailing chromatographieren. Als mobile Phase verwendete er Methanol/Wasser (70:30). Die Detektion erfolgte bei 270nm und 254nm. Als stationäre Phase fungierte eine RP-8-Säule.

9.3 Das Hg-Thiooxin

Es wurde die Möglichkeit der Hg-Bestimmung mit Thiooxin als Komplexbildner auf RP-Phasen untersucht. Nach dem Scan des Hg-Peaks erwies sich eine Wellenlänge von 260nm als geeignet. Ein zweiter Gipfel erschien bei 370nm.



Die mobile Phase bestand aus Methanol/Wasser (80:20), die stationäre Phase aus einer RP-C18-Säule. Die Ofentemperatur betrug 35 °C, der Flow hatte eine Geschwindigkeit von 1ml/min. Unter diesen Bedingungen konnte die Nachweisgrenze bis auf 0,5ng pro Injektion (10µl) gesenkt werden.

Abb. 9.2a Leerwert Thiooxin Flow 1ml/min;
Wellenlänge 260nm; Temperatur 35 °C;
Stationäre Phase: RP-C18 125x8x4mm (Nucleosil)
Mobile Phase: MeOH/H₂O (80:20)

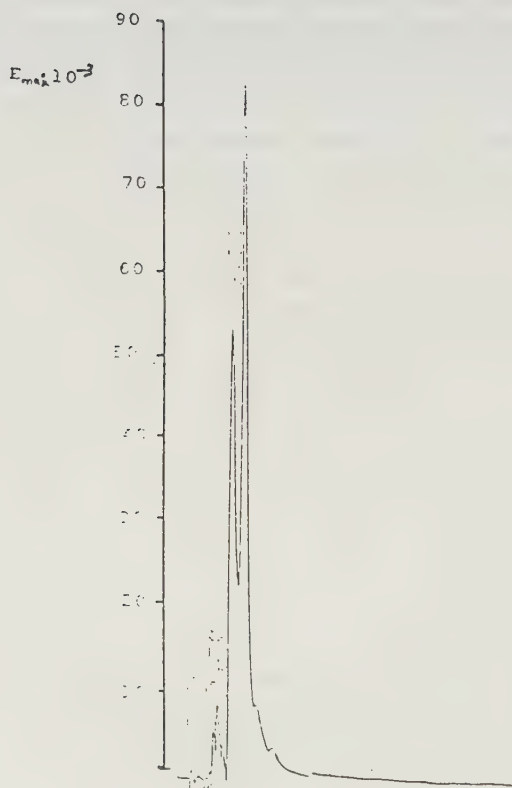


Abb. 9.2b 50ng Hg-Thiooxinat weitere Parameter
siehe Abb. 9.2a Detektionszeit 6.95min

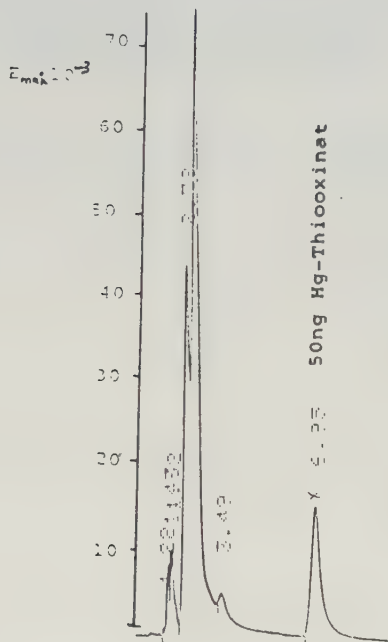


Abb. 9.2c 10ng Hg-Thiooxinat Detektionszeit 7.07min
weitere Parameter siehe 9.2a

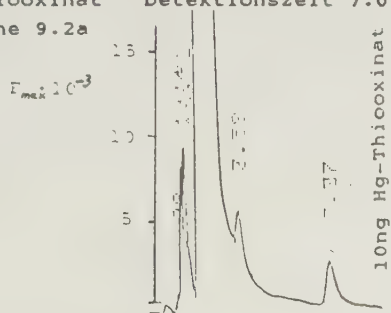
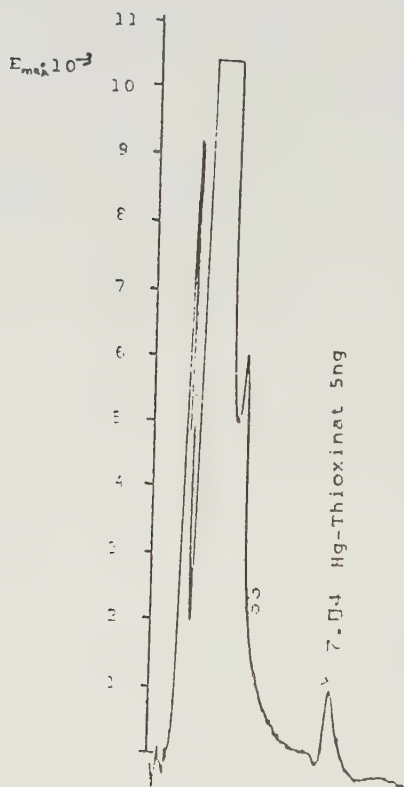


Abb. 9.2d 5ng Hg-Thiooxinat Flow 1ml/min;
 Wellenlänge 260nm; Temperatur 35 °C;
 Stationäre Phase: RP-C18 125x8x4mm (Nucleosil)
 Mobile Phase: MeOH/H₂O (80:20)
 SLP SENS geändert von 0.20 auf 0.10; Detektionszeit 7.04min



Mit höherer Empfindlichkeit (ATTN 2↑2) wurden zwar die Störpeaks breiter, dies beeinflusste aber nicht die Chromatographie des Hg-Thiooxinat. Die t_R -Werte liegen reproduzierbar zwischen 6.94min und 7.18min und gut getrennt von den bei ATTN 2↑2 auftretenden neuen Peaks, die sich aus der Grundlinienschwankung ergeben (s. Abb. 9.2e, 9.2f).

Abb. 9.2e 1ng Hg-Thiooxinat SLP SENS 0.05
Detektionszeit 7.18min; weitere Parameter siehe 9.2d

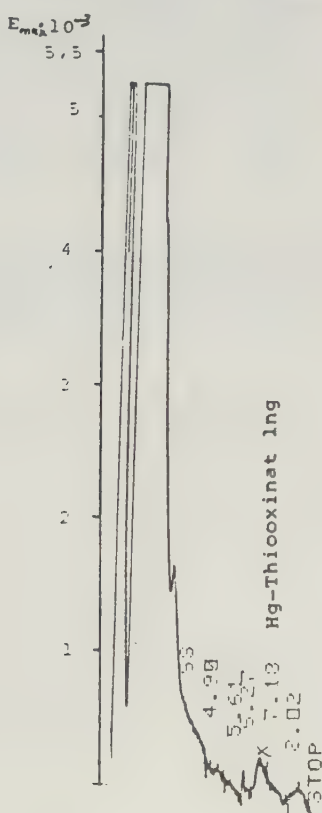
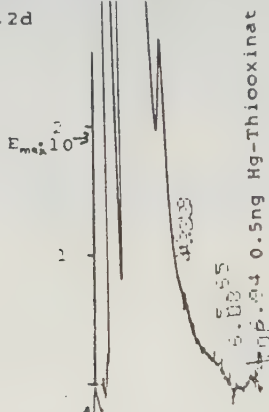


Abb. 9.2f 0.5ng Hg-Thiooxinat

Detektiionszeit 6.94min; SLP SENS 0.05; weitere
Parameter siehe 9.2d



9.4 Diskussion

Cd lässt sich nicht mit Chloroform extrahieren. As kann im saueren und Tl im alkalischen Bereich extrahiert werden, jedoch gelingt die Chromatographie mit der HPLC weder auf Normal-, noch auf RP-Phasen. Co, Cu und Pb sind auf RP-Phasen nur sehr unbefriedigend chromatographierbar.

Im Mittelpunkt der weiteren Untersuchungen steht die Chromatographie von Hg-Thiooxinat.

Bei einer Wellenlänge von 260nm liegt das Absorptionsmaximum für das Hg-Chelat. Mit einer Nucleosil 5 C18 Säule als stationäre Phase, einem Methanol/Wassergemisch von 80:20 und einem Flow von 1ml/min, kann die Nachweisgrenze des Hg-Thiooxinates bis auf 0.5ng (FN) pro Injektion (10µl) gesenkt werden. Die Retentionszeit für Hg=7min.

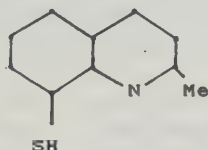
Dies reicht nicht aus, um die physiologischer Weise im Harn auftretende Hg-Menge von ca. 1µg pro Tag (Forth (1980)) festzustellen. Chronische oder akute Quecksilber-Intoxikationen müßten sich aber in den meisten Fällen nachweisen lassen.

FN

In der Literatur liegen bei Verwendung der HPLC die erreichten Nachweisgrenzen für Hg höher. Bisher erreichten Heizmann und Ballschmiter 1ng - 2ng (siehe Kap. 3.1.2.3).

10. Das 2-Me-8-Mercaptochinolin

Durch die sterische Hinderung und die abschirmende Wirkung der Methylfunktion verändert sich das chromatographische Verhalten.



So werden keine Komplexe mehr mit Mn, Fe und Cu gebildet.

10.1 Extraktionsverhalten der 2-Me-Thiooxinate

Co, Ni, Zn, Cd, Hg, Tl, Pb und As lassen sich nach Schneeweis (1982) mit Chloroform extrahieren. Nach Bankovskii (1978) schwankt der pH-Bereich maximaler Extraktion weit um pH 7. Eine Ausnahme bildet nur Tl (pH 10.0-14). Für As macht er keine Angaben.

10.2 Die Verwendung des 2-Me-Thiooxins zur Chromatographie von Metallchelaten

Schneeweis (1982) konnte mit der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60 mit Chloroform als Fließmittel V, Ph, Pd, Ir, Pt, Sb, Bi, Se, Te und die toxisch relevanten Thiooxinate von Co, Ni, Zn, Cd, Hg, Tl, Pb und As nachweisen. Fe und Cu ließen sich nicht chromatographieren. Die Verwendung anderer Fließmittel und von Aluminiumoxid 60 brachten keine wesentlichen Unterschiede und erwies sich eher als nachteilig.

Die von ihm angegebenen R_f-Werte auf Kieselgel 60 mit Chloroform liegen allerdings so nahe bei einander,

zwischen 0.10 für As und 0.19 für Cd, daß eine eindeutige Trennung mit der HPLC nicht zu erwarten ist. Eine Ausnahme macht hier nur das Hg-2-Me-Thiooxinat mit einem Rf-Wert von 0.47 - damit ist es auch von den anderen Chelaten separierbar.

10.3 Zur Problematik der Cd-Bestimmung

Unter verschiedenen Bedingungen wurde die Chromatographierbarkeit von Cd untersucht.

- Es wurde der Wasseranteil variiert (MeOH/H₂O von 95:5 bis 50:50), um die Retentionszeiten zu verlängern und eine bessere Peakdifferenzierung zu erreichen.

- Durch die Reduzierung des in der zu injizierenden organischen Phase enthaltenen 2-Me-Thiooxins von 1% auf 0.2% verkleinerten sich die Störpeaks.

- Um bei relativ hohem Wasseranteil nicht zu lange Analysenzeiten in Kauf nehmen zu müssen, wurde ein Gradient mit steigendem Methanolanteil gefahren.

- In Anlehnung an Drasch, v.Meyer und Kauert (1982), die, ausgehend von der guten Löslichkeit der Metallchelate in halogenierten Kohlenwasserstoffen, durch Zugabe von Chloroform zum Methanol/Wassergemisch eine Verbesserung der Chromatographie erreichen konnten, verwendeten wir ebenfalls ein Eluat aus Methanol/Wasser/Chloroform (25:55:20).

- Durch Zugabe von 14mg 2-Me-Thiooxin zu 1l Methanol/Wassergemisch (70:30) wurden die durch den Chelatbildner verursachten Störpeaks verkleinert. (Vorgehensweise: siehe Anhang I)

Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 260nm.

Ein Cd-Nachweis gelang jedoch nicht.

Mit Hilfe der Atomabsorptions-Chromatographie (Gerät: Perkin-Elmer 300 SG) konnte aber die Komplexbildung von Cd mit 2-Me-Thiooxin sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden.FN

10.4 Pb, Zn, As und Tl

Unter den gleichen Bedingungen, mit denen der Cd-Nachweis versucht wurde, wurde die Chromatographie der Pb-, Zn-, As- und Tl-Chelate, gemessen bei 220nm und 320nm Wellenlänge, vorgenommen. Auch hier konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden.

FN

Zu diesem Zweck wurden 1ng Cd-2-Me-Thiooxinat mit 1ng Cd-Diethyldithiocarbaminat, das als Komplexbildner für Cd in der HPLC bekannt ist (siehe Drasch et al. (1982c)), und einer Referenzprobe von 100pg einer Cd-Stammlösung für die AAS verglichen. (Zur Extraktion siehe Kap. 7 - hier wurde allerdings die 100mg% Stammlösung dahingehend verdünnt, daß sich pro 20µl Einspritzmenge ein Schreiberausschlag entsprechend 1ng Cd ergeben sollte)

Die mit der AAS gemessene Menge an Cd pro Injektion für Cd-Diethyldithiocarbaminat und Cd-2-Me-Thiooxinat entsprach annähernd 1ng. Die Peaks waren reproduzierbar.

Die Peakhöhen unterschieden sich nur um ca. 5% von einander, wobei der größere Peak vom Cd-2-Me-Thiooxinat verursacht wurde.

Die im Überstand der Extraktion verbliebene Menge an "freiem", nicht chelatisierten Cd entsprach nach der Komplexbildung mit dem 2-Me-Thiooxinat einer Menge von ca. 25pg Cd.

Zur Kontrolle wurde eine Extraktion von Cd ohne Chelatbildner durchgeführt und sowohl die Chloroform- als auch die wässrige Phase mit der AAS auf ihren Gehalt an Cd untersucht. Es ergaben sich genau umgekehrte Verhältnisse bezüglich der Cd-Ausbeute. In der wässrigen Phase des Überstandes wurde in etwa die selbe Menge an Cd gemessen wie zuvor in der organischen Phase. Die nicht den Chelatbildner enthaltende Chloroformphase nahm dagegen fast kein Cd auf.

Damit konnte eine Cd-Chelatbildung mit dem 2-Me-Thiooxinat nachgewiesen werden. Die Entstehung des Cd-Peaks durch unkomplexiertes Cd konnte ausgeschlossen werden.

10.5 Das Hg-2-Me-Thiooxin

Zuerst wurde der Hg-Nachweis mit 500ng Hg-Chelat geführt. Als Fließmittel wurde Methanol/Wasser (70:30), dem 2-Me-Thiooxin zugesetzt worden war, verwendet. Die t_R Zeit des Hg-Peaks betrug 2.80min. Der Scan dieses Peaks ergab zwei Absorptionsmaxima bei 260nm und 320nm.

10.5.1 Optimierung des Hg-Nachweises

Um einen größeren Abstand von den Störpeaks des Thiooxins und des Chloroforms zu erreichen, die durch ihren großen Überschuss das Bild der Chromatographie bestimmen, wurde der Anteil des Wassers als schwächstes Elutionsmittel auf 40% erhöht. Die Folge war ein größerer Abstand zwischen den Peaks. Die Retentionszeit des Hg-Chelats lag nun bei t_R 4.5min. Gleichzeitig verlängerte sich aber auch die Elutionszeit der letzten Störpeaks auf über 30min. Mit der Gradientensteuerung konnte die ganze Analyse auf 19min verkürzt werden. Zu diesem Zweck wurde der Methanolanteil nach der Chromatographie des Hg-2-Me-Thiooxins von der 6. bis zur 8. Minute auf 95% gesteigert. Nach 15min erfolgte bis zur 17. Minute wieder eine Angleichung an den Ausgangswert von 60% Methanol, der noch weitere 2min gefahren wurde, um eine Stabilisierung des Pumpensystems zu erlangen. (s. Abb. 10.3 b-e)

10.5.2 Eichkurven zur Bestimmung der Nachweisgrenze von Hg-2-Me-8-Mercaptochinolin

Unter den oben genannten Bedingungen wurden zwei Eichkurven anhand von 100ng, 75ng, 50ng, 15ng, 10ng und 5ng Hg-Chelat ermittelt. Die Detektion wurde zweimal wiederholt und aus den ermittelten Werten die Regressions-

geraden für errechnete Flächen (Abb. 10.1) und Höhen pro Peak bestimmt (s. Abb. 10.2, S. 82).

Abb. 10.1 Regressionsgerade für verschiedene Hg-Injektionen bei $n=3$ berechnete Flächen pro Peak. Korrelationskoeffizient: $K = .995$. Gradientensteuerung: 1min-8min MeOH/H₂O (60:40), 8min-17min MeOH/H₂O (95:5), 17min-19min MeOH/H₂O (60:40); Stationäre Phase: RP-C18 125x8x4mm Nucleosil); Wellenlänge: 320nm; Detektionszeit: 4.5min; Flow: 1ml/min

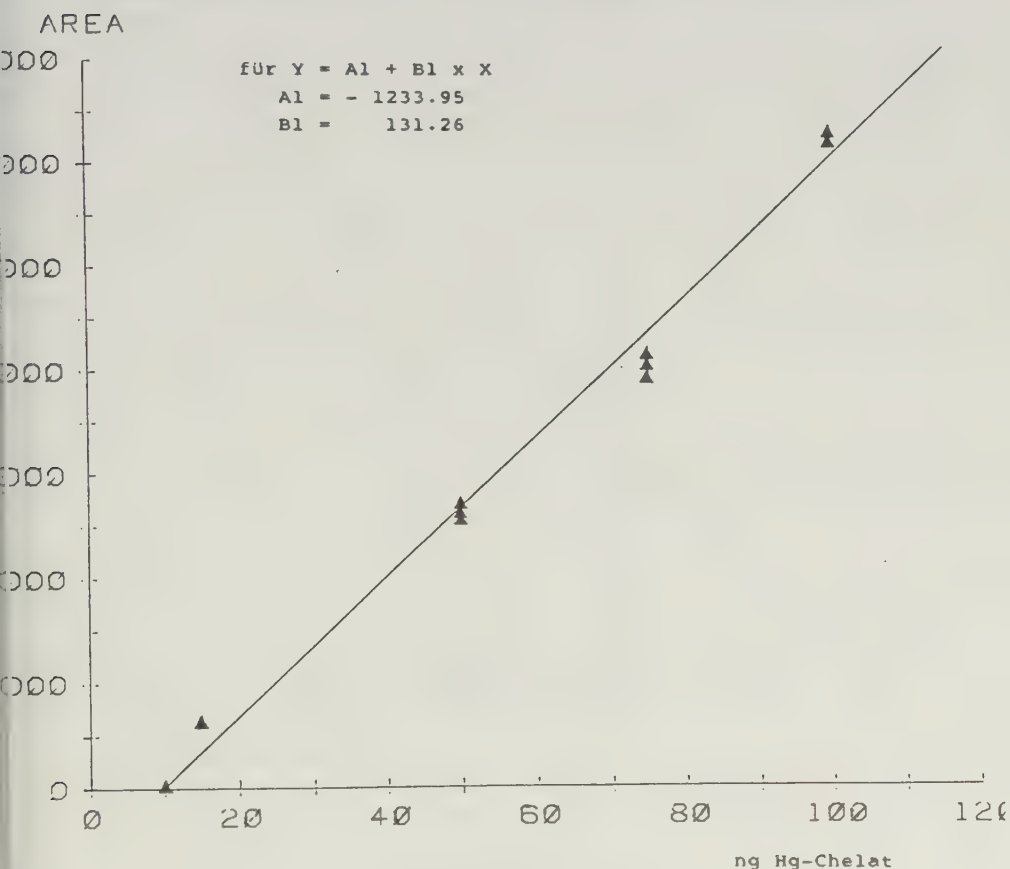


Abb. 10.2 Regressionsgerade für berechnete Peakhöhen.
Korrelationskoeffizient = .995; weitere Parameter siehe
Abb. 10.1

HOEHE (CM)

für $Y = A1 + B1 \times X$

$A1 = -.4936$

$B1 = 9.280$

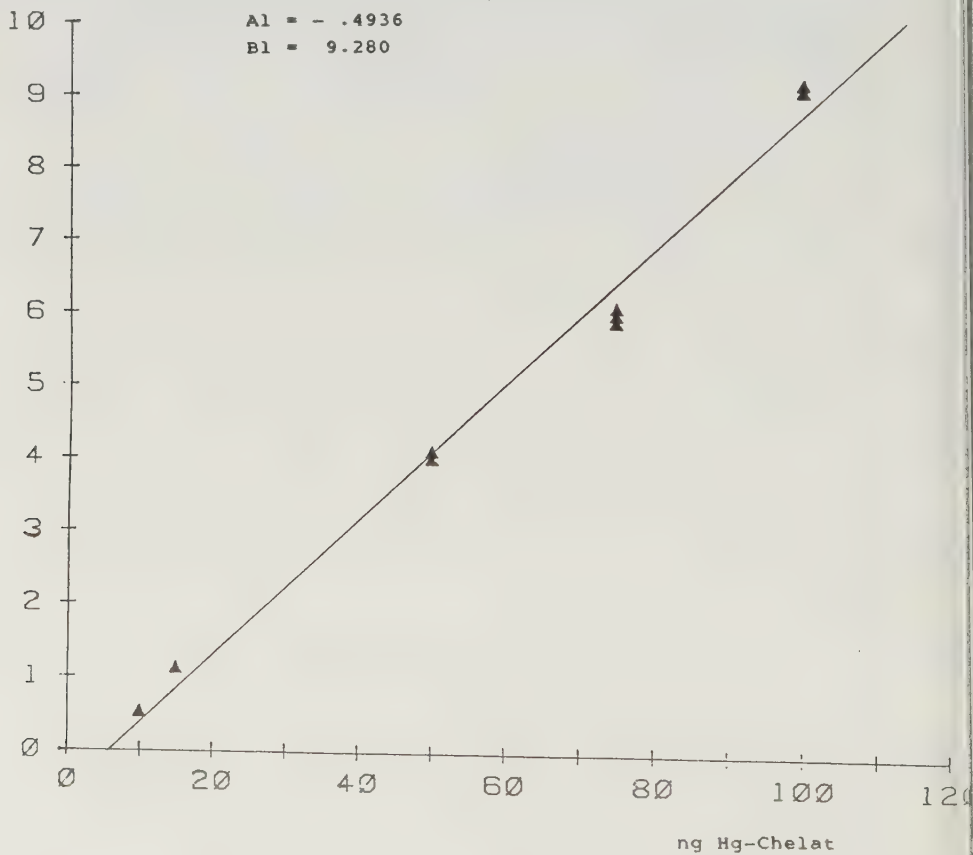


Abb. 10.3b 100ng Hg-2-Me-Thiooxinat
 Flow: 1ml/min; Wellenlänge 320nm; Detektionszeit 4.31min;
 Stationäre Phase: RP-C18 125x8x4mm (Nucleosil);
 Mobile Phase mit Gradienten:

6min MeOH 60%
 8min MeOH 95%
 15min MeOH 95%
 17min MeOH 60%
 19min STOP

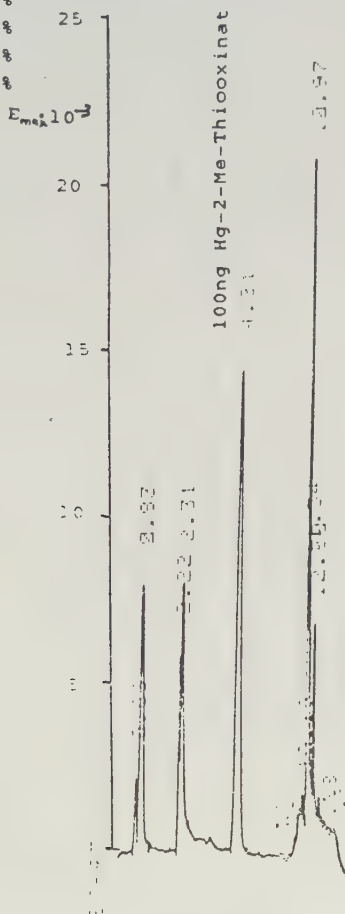


Abb. 10.3c 50ng Hg-2-Me-Thiooxinat

Parameter siehe Abb. 10.3b; Detektionszeit 4.32min

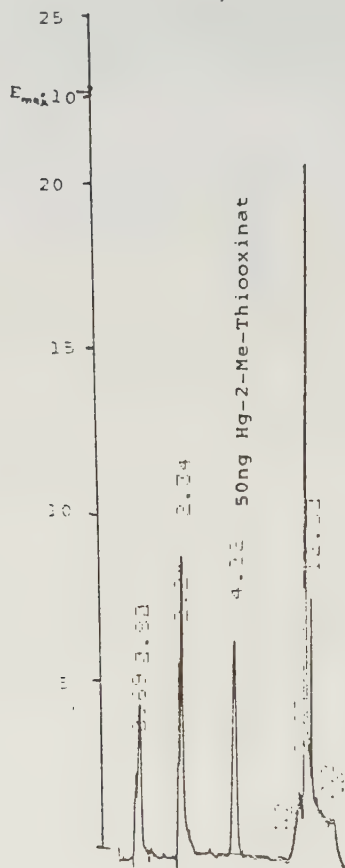


Abb. 10.3d 10ng Hg-2-Me-Thiooxinat

Parameter siehe Abb. 10.3b; Detektionszeit 4.68min

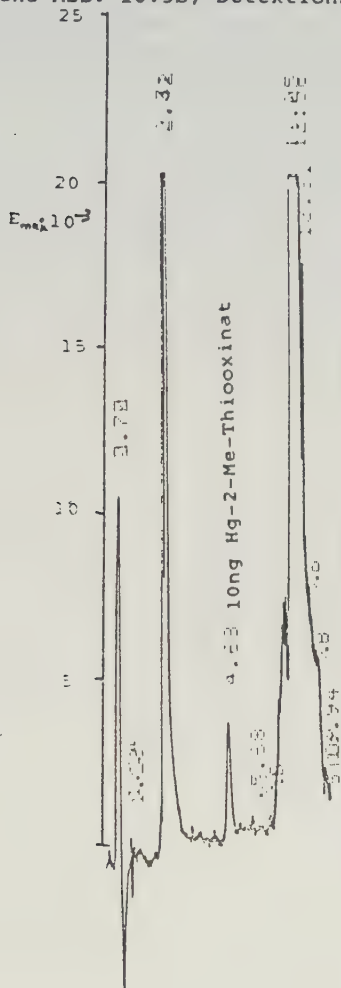
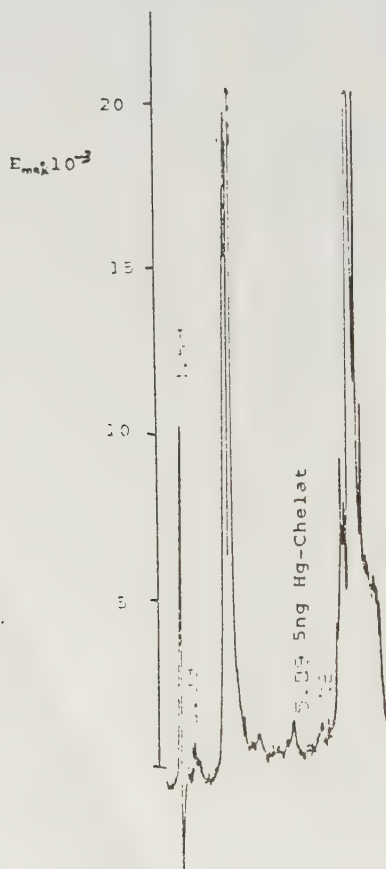


Abb. 10.3e 5ng Hg-2-Me-Thiooxinat

Parameter siehe Abb. 10.3b; Detektionszeit 5.09min



10.6 Diskussion

Trotz der Fähigkeit des 2-Me-8-Mercaptochinolins zur Komplexbildung mit allen toxisch relevanten Schwermetallen, außer Cu, Fe und Mn, und deren Extrahierbarkeit mit Chloroform, ist es nicht für die RP-HPLC verwendbar.

Eine Ausnahme bildet nur das Hg-Chelat, das sich gut detektieren läßt. Die Nachweisgrenze liegt mit optimierter Methode, unter Verwendung eines Gradienten, bei einem anfänglichen Methanol/Wasserverhältnis von 60:40 und einer Wellenlänge von 320nm, bei 5ng pro Injektion (10µl). Die Retentionszeit liegt unter diesen Bedingungen bei 4.5min.

11. Diskussion

Die Schwierigkeit, die dünnschichtchromatographischen Eigenschaften der Thiooxinate (König (1979); Schneeweis (1982); Steinbrech (1982)) auf die RP-HPLC zu übertragen, zeigt sich besonders deutlich anhand des 2-Me-Thiooxinats.

Das 2-Me-8-Mercaptochinolin bildet auf Kieselgel mit Chloroform als Fließmittel nach Schneeweis (1982) gut chromatographierbare Komplexe mit den Schwermetallen Co, Ni, Zn, Cd, Hg, Tl, Pb und As. Mit Cu, Fe und Mn kann es keine Komplexe mehr bilden.

Mit der RP-HPLC läßt sich aber nur Hg bestimmen. Eine Chelatbildung des Cd mit dem 2-Me-Thiooxinats konnte mit Hilfe der AAS aber nachgewiesen werden.

Mehrere Gründe kommen für die schlechte Verwendbarkeit der Chelate zur Chromatographie mit der Reversed-phase-HPLC in Frage. So kann das Tageslicht nach Koch/Koch-Dedic (1974) die Stabilität der Komplexe stören. Schunk und Schwedt (1983/1984) weisen auf den Einfluß des pH-Wertes der wäßrigen Lösung und die Bedeutung des Wassers als Eluenten auf die Zersetzung des Metallkomplexes hin. Ein weiterer Grund kann nach Schwedt (1979a) und Scharfe (1973) im Zentralatom selbst liegen. Shih und Carr (1981) machen die katalytische Zersetzung in der Metallsäule für die Destruktion des Chelatkomplexes verantwortlich. Auf die Möglichkeit der Zersetzung während der Chelatextraktion durch den Lichteinfluß wird von Schunk und Schwedt (1984) ebenfalls hingewiesen.

Durch die Verwendung anderen Säulenfüllmaterials und empfindlicherer Detektoren könnten sich die Möglichkeiten der Schwermetallbestimmung mit dem 2-Me-8-Mercaptochinolin und den beiden anderen Komplexbildnern weiter verbessern.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit gibt eine Einführung in die Theorie der Chelatbildung und der Chromatographie.

Ein Überblick über die verschiedenen chromatographischen Verfahren, verwendete Chelatbildner und ihre Eignung zur Analyse von Schwermetallen umreißt den aktuellen Stand der Forschung.

Es werden Möglichkeiten der Optimierung der Trennung auf RP-Phasen mit der HPLC aufgezeigt.

Die Verwendbarkeit der Komplexbildner 8-Hydroxychinolin, 8-Mercaptochinolin und 2-Me-8-Mercaptochinolin für die RP-HPLC wird untersucht.

Mit dem 8-Hydroxychinolin läßt sich auf RP-Phasen Cu-Oxinat bei 410nm, Co-Oxinat bei 400nm und Pb-Oxinat bei 450nm gut chromatographieren. Tl, As, Cd und Hg lassen sich nicht detektieren. Das geeignetste Fließmittel stellt eine Mischung aus Methanol/Wasser/Chloroform im Verhältnis 55:25:20 mit Zusatz von 1ml 1% Oxinlösung/l dar. Unter Verwendung einer RP-C18-Säule (125x8x4mm; Korngröße: $5\pm 1,5\mu\text{m}$) von Macherey & Nagel (Düren) liegen die Retentionszeiten bei einem Flow von 1ml/min für Cu bei 5.10min, für Pb bei 1.92min und für Co (mit Methanol/Wasser 75:25 detektiert) bei 6.13min.

Das Schwefelanalogon des 8-Hydroxychinolins, das 8-Mercaptochinolin eignet sich zur Bestimmung des Hg. Mit einem Fließmittel aus Methanol/Wasser (80:20) und bei einer Wellenlänge von 260nm läßt sich die Nachweisgrenze bis auf 0.5ng pro Injektion (10 μl) senken. Der Hg-Peak erscheint unter Verwendung der obengenannten Säule (Flow: 1ml/min) nach 7min. Die erreichte Nachweisgrenze ist für die Feststellung einer akuten oder chronischen Quecksilbervergiftung ausreichend, wenn mit dem Urin ca. 100 μg Hg/Tag oder mehr ausgeschieden werden.

Mit dem 2-Me-8-Mercaptochinolin lassen sich zwar alle toxisch relevanten Schwermetalle außer Cu, Fe und Mn in Chloroform im neutralen pH-Bereich extrahieren, auf die RP-HPLC sind diese Eigenschaften des Chelatbildners zur Komplexbindung aber nicht übertragbar.

Nur das Hg-2-Me-8-Mercaptochinolin zeigt eine gute Chromatographierbarkeit auf RP-Phasen. Durch Optimierung gelingt eine Reduzierung der Nachweisgrenze bis auf 5ng pro Injektion (10µl). Unter Verwendung einer RP-C18 Säule von Macherey & Nagel (125x8x4mm), einem Flow von 1ml/min und einer Wellenlänge von 320nm wird bei einem anfänglichen Methanol/Wassergemisch von 60:40 der Hg-Peak nach 4.32min eluiert. Durch die Verwendung eines Gradienten wird die Gesamtanalysendauer verkürzt, indem der Anteil des Methanols von 60% nach 6min innerhalb von weiteren 2min auf 95% erhöht wird. Nach 15min wird das Ausgangsgemisch von 60:40 (MeOH:Wasser) wieder hergestellt. Nach 19min ist die Konditionierung der Säule für weitere Analysen abgeschlossen.

Anhang I

Eine Verringerung der Grundlinienschwankungen und Störpeaks kann durch Zugabe kleinster Mengen an Chelat zum Lösungsmittel (z.B. 15mg auf 1l) erreicht werden.

Das mit dem Chelat versetzte Lösungsmittel darf aber nicht unmittelbar an das HPLC-Gerät angeschlossen werden. Nach ca. 30min Durchmischung mit dem Magnetrührer, wird durch eine Nutsche filtriert, um nicht gelöste Bestandteile zu entfernen, und anschließend mit Helium weitere 30min entgast. Dies ist besonders wichtig, da restliche Luft die Chromatographie unmöglich machen würde und außerdem das HPLC-Gerät schädigen könnte.

Anhang II

1. Zur Darstellung des 2-Me-8-Mercaptochinolin, das nicht käuflich angeboten wird, wurden folgende Chemikalien verwendet:

Zinn(II)-Chlorid Dihydrat purum	von Fluka
Chlorsulfonsäure purum	"
Chinaldin pract.	"
Na-Hypophosphit	von Merck
Äthanol	"
Äther	"
Wasserstoffperoxid	
Natriumcarbonat	
Natronlauge	
dest. Wasser	

2.

(modifiziert nach Schneeweis (1982))

50ml Chinaldin werden tropfenweise zu 250ml eisgekühlter Chlorsulfonsäure gegeben. Diese muß intensiv gerührt

werden. Danach wird die Lösung 3 Stunden bei 130 °C erhitzt. Es entstehen anfangs weiße Nebel, die etwa nach 2 Stunden verschwinden. Man läßt die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen und gießt sie mit Hilfe eines Glasstabes auf etwa 2 kg Eis. Vorsicht! Chlorsulfonsäure reagiert heftig mit Wasser. Dabei fällt aus der dunkelbraunen Lösung ein weißer amorpher Niederschlag aus. Dieser wird auf Zimmertemperatur erwärmt, durch ein Glasfilter abgesaugt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Der Niederschlag darf nicht trocken gesaugt werden, sonst führt dies zu einer Zersetzung des Sulfochlorids.

100g feuchtes Chinaldin-8-sulfochlorid werden in 400ml 37% Salzsäure gelöst (absitzen lassen, dekantieren und dunkelbraunen Bodensatz verwerfen) und unter Rühren 40% Zinn(II)-chlorid-Lösung in 37% HCl zugegeben. Die Lösung erwärmt sich dabei auf etwa 40 °C und verfärbt sich orangegelb. Gelber kristalliner Niederschlag fällt aus. Das Chlorostanatsalz wird durch einen Membranfilter (0.3µm) abgesaugt und zuerst mit konzentrierter, später mit halb konzentrierter Salzsäure nachgewaschen, um überschüssiges Zinn(II)-chlorid zu entfernen.

50g gelbes Chlorostanatsalz werden in einem Mörser mit ca. 100ml 20% Natronlauge verrührt, bis eine hellbraune Paste entsteht. (Verfärbt sich die Paste orange, so muß weiter Natronlauge zugesetzt werden)

Die hellbraune Paste (das Natriumsalz des 2-Me-8-Mercaptochinolins) wird mit 2.5l destilliertem Wasser in Lösung gebracht und durch ein Glasfaserfilter von unumgesetztem Chlorostanatsalz, sowie ausgefallenem Komplex abfiltriert. Die vereinigten Natriumsalzlösungen werden mit ca. 150ml 5% Wasserstoffperoxidlösung versetzt. Es fällt weißes flockiges 8,8'-(2,2'-Dimethyl)-chinolyldisulfid aus. Zur vollständigen Fällung wird ca. 10g-15g Natriumchlorid zugesetzt. Der Niederschlag wird durch ein Glasfaserfilter abgesaugt und 5mal mit destilliertem Wasser nachgewaschen.

Das Disulfid ist die beständigste Lagerform.

Ausbeute ca. 20% bezogen auf Chinaldin (= 143,19g/mol)

Zur Weiterverarbeitung wird das Disulfid in 6n Salzsäure (ca. 15ml) gelöst und nach Zugabe von doppeltem Überschuß an Na-Hypophosphit (0.53g) 1 Stunde am Rückfluß erhitzt. Um Sauerstofffreiheit zu gewährleisten, wird mit Argon begast. Es werden 120ml dest. Wasser zugegeben. Nach dem Abkühlen der Lösung wird mit reichlich Natriumcarbonat ein pH von 5 eingestellt. Bräunlich-gelber Niederschlag entsteht. Im Kühlschrank wird die Lösung längere Zeit stehengelassen, bis rotes Mono- oder Dihydrat der freien Verbindung auskristallisiert. Dieses wird über eine Nutsche abfiltriert und muß sofort weiterverarbeitet werden, da andernfalls Zersetzung eintritt.

Dazu wird es mit 16% Natronlauge (etwa 4g NaOH in 25ml H₂O dest.) in einem Mörser verrührt, bis eine blaße, gelbgrüne Paste entsteht (ist sie noch leicht orange, muß weiter NaOH zugesetzt werden). Diese wird mit einer Nutsche wiederum trockengesaugt, indem man die Paste dünn auf dem Glasfaserfilter verstreicht. Danach wird sie in 200ml Äthanol aufgelöst (dazu im Wasserbad erwärmen).

Anschließend wird nochmals filtriert, der Überstand in 300ml Äther gelöst und im Kühlschrank unter Luftabschluß stehen gelassen.

Abschließend wird mit der Nutsche getrocknet und mit wenig Äther nachgespült. Man erhält das Na-Salz.

FN

Um den langwierigen Syntheseweg abzukürzen, wurde der Versuch unternommen, schon das rote Mono/Dihydrat der freien Verbindung in Chloroform zu lösen. Es ließ sich aber nicht für die Chromatographie verwenden, da anscheinend schon geringste Mengen Luft zu einer Zersetzung des Chelatbildners führen.

Literaturverzeichnis

- AMIN, M., JAKOBS U. Fresenius Z. Anal. Chem. 268, 119 (1974)
- BANKOVSKII, YU.A. Chemie der Innerkomplexverbindungen des Mercaptochinolins und seiner Derivate. Verlag Sinate, Riga (1978)
- BELINKY, B.R. ACS Symposium Series, Am. Chem. Soc. Washington 220, 149 (1980)
- BERG, R. Das O-Oxychinolin "Oxin". Stuttgart (1935)
- BERTHOD, A., KOTOSKY, M., ROCCA, J.C., VITTORI, O. Analysis 7, 395 (1979)
- COLIN, H. KRUSTULOVIC, A., GUIOCHON, G. J. Chromatogr. 255, 295 (1983)
- D'ANS'LAX "Taschenbuch für Chemiker u. Physiker", Bd. 1, Springer Verlag (1967)
- DRASCH, G., v.MEYER, L., KAUERT, G. Zwischenbericht an die Deutsche Forschungsgemeinschaft (1982a)
- DRASCH, G., v.MEYER, L., KAUERT, G. Fresenius Z. Anal. Chem. 311, 571 (1982b)
- DRASCH, G., v.MEYER, L., KAUERT, G. Fresenius Z. Anal. Chem. 311, 695 (1982c)
- DRASCH G., KAUERT G., v. Meyer L, The detection of heavy metals from biological material by GLC and HPLC via the diethyldithiocarbamates (DEDTC). In: Brätter P, Schrammel P (eds) Trace element - Analytical chemistry in medicine and biology, vol 2, Walter de Gruyter, Berlin New York, 1109, (1983)
- DRASCH, G., v.MEYER, L., KAUERT, G. Fresenius Z. Anal. Chem. 317, 468 (1984)
- EBERHARDT, R., LEHNER, H., SCHLOEGL, R., Mh. Chem. 104, 1409 (1973)
- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W. Allg. und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 3. überarb. Aufl. Bibliogr. Institut Mannheim, Wien, Zürich (1980)
- ENGELHARDT, H. Habil.Schrift Nürnberg/Erlangen (1971)
- ENGELHARDT, H. Die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie Springer Verlag Berlin/Heidelberg, New York (1975)

GLAJCH, J.L., KIRKLAND, J.J., SQUIRE, K.M. 199, 57 (1980)

GREENWOOD, J.M. et al. J. Organometal. Chem. 38, 345 (1972)

HÄRING, N., BALLSCHMITER, K., Talanta 27, (1980)

HAMBALI, C.S., HADDAD, P.R. Chromatographia 13, 633 (1980)

HEFTMANN, E. Chromatogr. Vol 22A (1980)

HEIZMANN, P., BALLSCHMITER, K. Fresenius Z. Anal. Chem. 266, 206 (1973)

HEIZMANN, P., BALLSCHMITER, K. J. Chromatogr. 137, 153 (1977)

HEWLETT-PACKARD Liquid Chromatograph, Operating Manual (1978)

HOFFMAN, B.W., SCHWEDT, G. Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications. Alfred Hüthing Verlag Heidelberg, New York 5, 439 (1982)

HOLLINGSHEAD, R.G.W. Oxine and its Derivates. Butterworth Scientific Publications (1954/1956)

HUBER, J.F.K. Instrumentation for High-Performance Liquid Chromatography J. Chromatogr. Vol 13 (1978)

HUBER, J.F.K., KRAAK, J.C., VENNING, H. Anal. Chem. 44, 1554 (1972)

HUTCHINS, S.R., HADDAD, P.R., DILLI, S. J. Chromatogr. 252, 185 (1982)

ISSAQ, H.J., KLOSE, J.R., MCNITT, K.L., HAKY, J.E., MUSCHIK, G.M. J. Liquid Chrom. 4, 2091 (1981)

ISSAQU, H.J. Hrs. KALASZ, H. in: New Approches in Liquid Chromatography. "The Mobile Phase in Liquid Chromatography" Analyt. Chem. Symposia Series Vol 16 Elsevier Amsterdam (1984)

JINNO, J. OZAKI, N., SATO, T. Chromatographia 17, 6 (1983)

KETTRUP, A., GROTE, M. "Herstellung selektiver chelatbildender Ionenaustauscher zur Anreicherung von Metallen" Opladen: Westdeutscher Verlag (1981)

KOCH, O.G, KOCH-DEDIC, G.A. "Handbuch der Spurenanalyse" 2. Aufl. Springer Verlag (1974)

KÖNIG, K.-H., SCHNEEWEIS, G., STEINBRECH, B. Fresenius Z. Anal. Chem. 297, 138 (1979)

KÖNIG, K.-H., SCHNEEWEIS, G., STEINBRECH, B. Fresenius Z. Anal. Chem. 316, 13 (1983)

LOHMÜLLER, M., HEIZMANN, P., BALLSCHMITER, K. J. Chromatogr. 137, 165 (1977)

MANGIA, A. et al. Anal. Chim. Acta 92, 111 (1977)
 MARTIN, A.J.P., SYNGE, R.L.M. J. Biochem. 35, 1358 (1941)
 MELANDER, W., STOVEKEN, J., HORVATH, CS. J. Chromatogr. 199, 35 (1980)
 MORGAN, DREW J. Chem. Soc. 177, 1456 (1920)
 OHAHI, K., IWAI, S., HORIQUI, M. Buseki Kagaku, 31, E285 (1982)
 O'LAUGHIN, J.W. J. of Liquid Chrom. 7(S-1) (1984)
 PARRIS, N.A. "Instrumental Liquid Chromatography", J. Chromatogr. Vol 27, 2. neuüberarbeitete Aufl. Elsevier (1984)
 PEARSON, R.G. J. Am. Chem. Soc. 85, 3533 (1963)
 RÖMPPS CHEMIE-LEXIKON Stuttgart 7. Aufl. (1973)
 RÖSSNER, B., SCHWEDT, G. Fresenius Z. Anal. Chem. 315, (1983)
 SAITOH, K., SATOH, M., SUZUKI, N. J. Chromatogr. 92, 291 (1974)
 CHARFE, R.R. Anal. Chem. 45, 413 (1973)
 SCHMIT, J.A., HENRY, R.A., WILLIAMS, R.C., DIECKMANN, J.F. J. Chromatogr. Sci. 9, 654 (1971)
 SCHNEEWEIS, G. Diss. Frankfurt (1982)
 SCHNEEWEIS, G., KÖNIG, K.-H. Fresenius Z. Anal. Chem. 316, 16 (1983)
 SCHUNK, W., SCHWEDT, G. "Zur Reversed-phase Chrom. von Metallchelaten" Chromatographia Vol 17/1 (1983)
 SCHUNK, W., SCHWEDT, G. Fresenius Z. Anal. Chem. 318, 47 (1984)
 SCHWEDT, G. Fresenius Z. Anal. Chem. 288, 50 (1977)
 SCHWEDT, G. Chromatographia 11, 3 (1978)
 SCHWEDT, G. Chrom. 12, 5 (1979a)
 SCHWEDT, G. Chrom. 12, 9 (1979b)
 SCHWEDT, G. Fresenius Z. Anal. Chem. 301, (1980a)
 SCHWEDT, G. Fresenius Z. Anal. Chem. 304, (1980b)
 SCHWEDT, G. "Chromatogr. Methods in Inorganic Analysis" Dr. A. Hüthig Verlag, Basel, New York (1981)
 SCHWEDT, G., BUDDE, R. Chromatographia 15, 527 (1982)
 SHAIKH, B., TOMASZEWSKII J. Chromatogr. 17, 12 (1983)
 SHIH, Y.T., CARR, P.W. Talanta 28, 411 (1981)
 SIDGWICK, N.W. "The Electronic Theory of Valency" Oxford University Press, London (1927)
 SIDGWICK, N.W. Chem. Soc. 433, (1941)

SMITH, R.M., YANKEY, L.E. *Analyst.* 107, 744 (1982)

SNYDER, L.R. "Prinziples of Adsorption Chr." New York (1968)

STEINBRECH, B. Diss. Frankfurt (1982)

SUZUKI, N., SAITOH, K. *J. Chromatogr.* 138, 79 (1977)

TOLLINCHÉ, C.A., RISBY, T.H. *J. Chromatogr. Sci.* 16, 448 (1978)

TSWETT, M. *Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci. Biol. Sect.* 14 Nr. 6 (1903)

UDEN, P.C., PAREES, P.M., WALTERS, F.H. *Anal. Lett.* 8, 795 (1975a)

UDEN, P.C., WALTERS, F.H. *Anal. Chim. Acta* 79, 175 (1975b)

UDEN, P.C., BIGLEY, I.E. *Anal. Chim. Acta* 94, 29 (1977)

UMLAND, F. "Methoden der Analyse in der Chemie" Bd.9 Theorie und prakt. Anwendung von Komplexbildnern. Akadem. Verlagsgesellschaft Frankfurt (1971)

UMLAND, F. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 190, 186 (1962)

WANG, J.D., LI, J.Z., BAO, M.S., LU, P.C. *Chromatographia* 17, 5 244 (1983)

WATANABE, H. et al. *Anal. Chem.* 53, 738 (1981)

WENCLAWIAK, B. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 308, 120 (1981)

WENCLAWIAK, B. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 310, 144 (1982)

Lebenslauf

Ich wurde am 9. Mai 1957 als zweiter Sohn des Buchhändlers Herbert Strigl und seiner Frau Evelyn, geb. Wojkowsky, in Rosenheim geboren.

Von 1963-1968 besuchte ich die Volksschule in Rosenheim und Bad Aibling, von 1968-1978 das Ignaz-Günther-Gymnasium in Rosenheim. Abitur im Sommer 1978.

Von 1978-1979 leistete ich meinen Zivildienst in der Jugendherberge in Thalkirchen in München ab.

Das Medizinstudium begann ich im Sommersemester 1980 an der Ludwig Maximilians-Universität zu München.

Physikum im Frühjahr 1982

1. Staatsexamen im Herbst 1983
2. Staatsexamen im Frühjahr 1985

